



등록특허 10-2739572



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월10일
(11) 등록번호 10-2739572
(24) 등록일자 2024년12월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/54 (2024.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/54 (2013.01)
A61K 39/00114 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7042270(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년03월06일
심사청구일자 2023년12월06일
- (85) 번역문제출일자 2023년12월06일
- (65) 공개번호 10-2023-0170821
- (43) 공개일자 2023년12월19일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7029313
원출원일자(국제) 2018년03월06일
심사청구일자 2021년02월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/021220
- (87) 국제공개번호 WO 2018/165208
국제공개일자 2018년09월13일
- (30) 우선권주장
62/467,623 2017년03월06일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
US20100303811 A1
US20140242025 A1

- (73) 특허권자
알토 바이오사이언스 엘엘씨
미국 캘리포니아 92032 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920
- (72) 발명자
마커스 워렌 디.
미국 33025 플로리다, 미라마르, 에스더블유 29번가 8382
뉴먼 로버트
미국 33025 플로리다, 미라마르, 노스 커머스 파크웨이 2810
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 신세기

전체 청구항 수 : 총 5 항

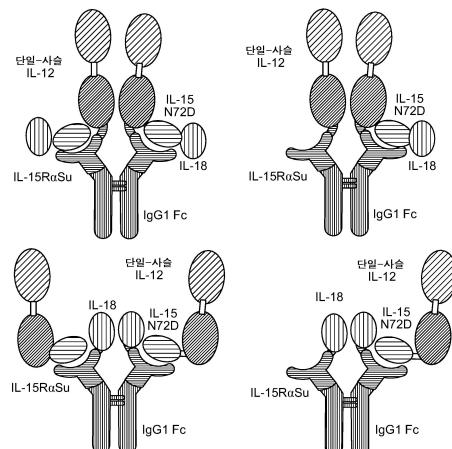
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 IL-12 및 IL-18로의 IL-15-기반 융합

(57) 요 약

본 발명은 IL-15 또는 기능적 변이체를 포함하는 하나의 도메인 및 IL-12 또는 IL-18에 특이적인 결합 도메인을 갖는 다중-특이적 융합 단백질 복합체를 특징으로 한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6811 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/5434 (2013.01)

C07K 14/5443 (2013.01)

C07K 14/715 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

리우 바이

미국 33024 플로리다, 쿠퍼 씨티, 엔더블유 39번가
9631

유 리정

미국 33025 플로리다, 미라마르, 노스 커머스 파크
웨이 2810

콩 린

미국 33025 플로리다, 미라마르, 노스 커мер스 파크
웨이 2810

로데 피터

미국 33025 플로리다, 미라마르, 노스 커머스 파크
웨이 2810

웡 헹 씨.

미국 33332 플로리다, 웨스톤, 웨스트월스 스트리트
2966

명세서

청구범위

청구항 1

환자에서 암, 바이러스 감염 또는 박테리아 감염에 의한 질환을 치료하는데 사용하기 위한 단리된 융합 단백질 복합체로서, 상기 복합체는 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩타이드 도메인 및 사이토카인 도메인을 포함하는 제1 가용성 단백질과, 가용성 IL-15 수용체 알파 스시 폴리펩타이드 도메인(IL-15R α Su) 및 사이토카인 도메인을 포함하는 제2 가용성 단백질을 포함하고,

상기 제1 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 8을 포함하고 상기 제2 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 6을 포함하거나, 또는 상기 제1 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 4를 포함하고 상기 제2 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 2를 포함하며,

상기 IL-15 폴리펩타이드 도메인은 가용성 IL-15R α Su와 결합하여 상기 융합 단백질 복합체를 형성하는, 단리된 융합 단백질 복합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 사용은 상기 융합 단백질 복합체를 포함하는 조성물을 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량만큼 투여할 수 있도록 제형(formulation)하는 것을 포함하는, 단리된 융합 단백질 복합체

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 유효량은 상기 융합 단백질 복합체 $1 \mu\text{g/kg} \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 인, 단리된 융합 단백질 복합체.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 암은 교모세포종, 전립선암, 혈액암, 다발성 골수종, B-세포 림프종, B-세포 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 피부 T-세포 림프종, T-세포 림프종, 고형 종양, 요로상피/방광 암종, 흑색종, 폐암, 신장 세포 암종, 유방암, 위암 및 식도암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 난소암, 비-소세포 폐 암종, 및 편평 세포 두경부 암종으로 구성된 군으로부터 선택되는, 단리된 융합 단백질 복합체.

청구항 18

제1항에 의한 단리된 융합 단백질 복합체를 제조하는 방법으로서, 제1 및 제2 가용성 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 단리된 숙주 세포에 도입하는 단계, 세포 또는 배지에서 상기 융합 단백질을 발현시키기 충분한 조건하에 상기 숙주 세포를 배지에 배양하는 단계, 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15Ra 도메인 사이의 결합을 허용하여, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성시키는 단계, 그리고 상기 숙주 세포 또는 배지로부터 상기 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2017년 3월 6일자로 출원된 미국 가출원 62/467,623의 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0003]

발명의 기술분야

[0004]

본 발명은 일반적으로 다량체 융합 분자의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

본원에 기재된 본 발명에 앞서, 면역 반응을 증강시키고 신생물 또는 감염성 질병을 갖는 환자에게 치료적 이익을 제공하기 위한 새로운 전략을 개발할 절박한 필요성이 있었다.

발명의 내용**과제의 해결 수단**

[0006]

본 발명은 다중-특이적 인터루킨-15(IL-15)-기반 융합 단백질 복합체가 면역 세포의 자극을 강화시키고 질병 세

포에 대한 이들의 활성을 촉진시킴으로써 질병의 감소 또는 예방을 초래한다는 놀라운 발견에 적어도 부분적으로 기반한다. 이들 IL-15-기반 융합 단백질 복합체는 또한 질병 및 표적 항원에 대한 결합 증가를 나타낼 수 있다. IL-12 및 IL-18 결합 도메인을 포함하는 다중-특이적 IL-15-기반 융합 단백질 복합체가 본원에 제공된다(도 1a, 도 1b). 구체적으로, IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15R α Su-Ig Fc 스캐폴드를 포함하는 융합 단백질 복합체가 본원에 기재된다. 하기에 상세히 기재되는 바와 같이, 인간 면역 세포를 사용하여 특성 확인될 때, 이들 융합 단백질 복합체는 IL-15, IL-12 및 IL-18 사이토카인 각각의 결합 및 생물학적 활성을 나타낸다. 추가로, 이들 융합 단백질 복합체는 상승된 활성화 마커, 종양 세포에 대한 증가된 세포독성 및 IFN- γ 의 향상된 생산을 갖는 사이토카인-유도된 기억-유사(cytokine-induced memory-like, CIML) 자연 살해(natural killer, NK) 세포를 유도한다.

[0007] 이와 같이, 단일 분자로서의 융합 단백질 복합체는 NK 세포상의 다수의 사이토카인 수용체에 결합하고 이를 통해 신호를 보내서 이전에 다수의 개별 사이토카인의 조합을 이용해서만 관찰된 반응을 제공한다. 추가로, 이들 융합 단백질 복합체는 Ig 분자의 Fc 영역을 포함하며, 이는 이량체를 형성하여 가용성 다중-폴리펩타이드 복합체를 제공하고, 정제 목적으로 단백질 A에 결합하고 NK 세포 및 대식세포 상의 Fc γ 수용체와 상호작용할 수 있음으로써, 개별 사이토카인의 조합에 존재하지 않는 융합 단백질 복합체에 대한 이점을 제공한다. 이들 융합 단백질 복합체를 임상 등급 물질의 대규모 생산에 적합하게 만드는 포유류 세포 발현-기반 방법이 본원에 기재된다. 본 발명의 융합 단백질 복합체에 의해 유도되는 CIML NK 세포를 제조하고 사용하기 위한 추가의 방법이 또한 제공된다.

[0008] 따라서, 적어도 2 개의 가용성 단백질을 포함하는 단리된 가용성 융합 단백질 복합체가 제공된다. 예를 들어, 제1 단백질은 IL-15 폴리펩타이드, 예를 들어 N72D 돌연변이를 포함하는 변이체 IL-15 폴리펩타이드(IL-15N72D)를 포함한다. 제2 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)(IL-15R α Su/Fc)을 포함한다. 단리된 가용성 융합 단백질 복합체의 제3 성분은 IL-12의 결합 도메인을 포함하며, 여기서 IL-12 결합 도메인은 IL-15N72D 또는 IL-15R α Su/Fc 단백질에 융합된다. 단리된 가용성 융합 단백질 복합체의 제4 성분은 IL-18의 결합 도메인을 포함하며, 여기서 IL-18 결합 도메인은 IL-15N72D 또는 IL-15R α Su/Fc 단백질에 융합된다. 일부 경우에, IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인은 IL-15N72D 및 IL-15R α Su/Fc 단백질 둘 모두에 융합된다. 다른 경우에, IL-12 또는 IL-18 결합 도메인 중 하나는 IL-15N72D 또는 IL-15R α Su/Fc 단백질에 융합되고 또 다른 결합 도메인은 다른 하나의 단백질에 융합된다. 다른 경우에, 복합체는 IL-12 없이 IL-15N72D:IL-15R α Su-Ig Fc 스캐폴드에 융합된 IL-18 결합 도메인 또는 IL-12 없이 IL-15N72D:IL-15R α Su-Ig Fc 스캐폴드에 융합된 IL-18 결합 도메인을 포함한다. 융합은 단백질의 N- 또는 C-말단에서 이루어질 수 있다. IL-12 단백질은 p40 및 p35 IL-12 서브유닛의 이종이량체를 포함할 수 있다. 대안적으로, IL-12 단백질은 p40 및 p35 서브유닛이 가요성 폴리펩타이드 링커에 의해 연결된 단일-사슬 포맷을 포함할 수 있다. 단일-사슬 IL-12는 p35의 N-말단에 연결된 p40의 C-말단 또는 p40의 N-말단에 연결된 p35의 C-말단을 포함할 수 있다. 예시적인 융합 단백질 복합체는 IL-15N72D에 공유 결합으로 연결된 IL-18 폴리펩타이드 및 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질에 공유 결합으로 연결된 단일-사슬 IL-12 폴리펩타이드를 포함한다. 대안적으로, 융합 단백질 복합체는 IL-15N72D에 공유 결합으로 연결된 단일-사슬 IL-12 폴리펩타이드 및 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질에 공유 결합으로 연결된 IL-18 폴리펩타이드를 포함한다(도 1a, 도 1b).

[0009] 예시적인 제1 단백질은 SEQ ID NO: 2 및 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 제2 단백질은 SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 제1 단백질을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 서열을 포함한다. 제2 단백질을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 7에 제시된 서열을 포함한다. 일 양태에서, 핵산 서열(들)은 융합 단백질을 인코딩하는 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터, 번역 개시 신호, 및 리더 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 핵산 서열을 포함하는 DNA 벡터가 또한 제공된다. 예를 들어, 핵산 서열은 복제, 발현, 또는 둘 모두를 위한 벡터 내에 있다.

[0010] 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합으로 연결된 제1 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는 가용성 융합 단백질 복합체가 또한 제공된다. 예를 들어, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체는 다량체화, 예를 들어, 이량체화, 삼량체화, 또는 달리 다량체화된다(예를 들어, 4 개의 복합체, 5 개의 복합체 등). 예를 들어, 다량체는 동종 다량체 또는 이종 다량체이다. 가용성 융합 단백질 복합체는 공유 결합, 예를 들어 디설파이드 결합, 화학적 가교제에 의해 연결된다. 일부 경우에, 하나의 가용성 융합 단백질은 제1 가용성 단백질의 Fc 도메인을 제2 가용성 단백질의 Fc 도메인에 연결하는 디설파이드 결합에 의해 또 다른 가용성 융합 단백질에 공유 결합으로 연결된다.

- [0011] Fc 도메인 또는 이의 기능적 단편은 IgG Fc 도메인, 인간 IgG1 Fc 도메인, 인간 IgG2 Fc 도메인, 인간 IgG3 Fc 도메인, 인간 IgG4 Fc 도메인, IgA Fc 도메인, IgD Fc 도메인, IgE Fc 도메인, 및 IgM Fc 도메인; 마우스 IgG2A 도메인, 또는 이들의 임의의 조합로 구성된 군으로부터 선택된 Fc 도메인을 포함한다. 선택적으로, Fc 도메인은 변경된 보체 또는 Fc 수용체 결합 특성 또는 변경된 이량체화 또는 글리코실화 프로파일을 갖는 Fc 도메인을 초래하는 아미노산 변화를 포함한다. 변경된 보체 또는 Fc 수용체 결합 특성 또는 변경된 이량체화 또는 글리코실화 프로파일을 갖는 Fc 도메인을 생산하기 위한 아미노산 변화는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, IgG1 CH2의 위치 234 및 235(항체 컨센서스 서열에 기반한 넘버링)에서 류신 잔기(즉, ...P E L L G G...)의 알라닌 잔기(즉, ...P E A A G G...)에 의한 치환은 Fc 감마 수용체 결합의 손실을 초래하는 반면, IgG1 CH2의 위치 322(항체 컨센서스 서열에 기반한 넘버링)에서 라이신 잔기(즉, ...K C K S L...)의 알라닌 잔기(즉, ...K C A S L...)에 의한 치환은 보체 활성화의 손실을 초래한다. 일부 실시예에서, 이러한 돌연변이는 조합된다.
- [0012] 일부 양태에서, IL-12 또는 IL-18 결합 도메인은 폴리펩타이드 링커 서열에 의해 IL-15 폴리펩타이드(또는 이의 기능적 단편)에 공유 결합으로 연결된다. 마찬가지로, IL-12 또는 IL-18 결합 도메인은 폴리펩타이드 링커 서열에 의해 IL-15R α 폴리펩타이드(또는 이의 기능적 단편)에 공유 결합으로 연결된다. 선택적으로, IL-15R α 폴리펩타이드(또는 이의 기능적 단편)는 폴리펩타이드 링커 서열에 의해 Fc 도메인(또는 이의 기능적 단편)에 공유 결합으로 연결된다. 각각의 폴리펩타이드 링커 서열은 독립적으로 선택될 수 있다. 선택적으로, 폴리펩타이드 링커 서열은 동일하다. 대안적으로, 그것들은 상이하다.
- [0013] 선택적으로, 가용성 융합 단백질 중 적어도 하나가 하나 이상의 결합 도메인 또는 검출 가능한 표지를 포함하는 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체가 제공된다. 이러한 결합 도메인은 항체, 가용성 T 세포 수용체, 리간드, 가용성 수용체 도메인 또는 이의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 이러한 결합 도메인을 포함하는 IL-15-기반 융합 단백질 복합체는 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 번호 8,492,118에 이미 기재되어 있다. 검출 가능한 표지는 바이오틴, 스트렙토바이딘, 이의 효소 또는 촉매적 활성 단편, 방사성 핵종, 나노입자, 상자성 금속 이온, 또는 형광, 인광, 또는 화학 발광 분자, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0014] 본 발명은 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하는 방법을 제공한다. 방법은 a) 제1 단백질을 인코딩하는 적절한 제어 서열을 갖는 DNA 벡터를 제1 숙주 세포 내로 도입하는 단계, b) 세포 또는 배지 중에서 제1 단백질을 발현시키기에 충분한 조건 하의 배지 중에서 제1 숙주 세포를 배양하는 단계, c) 숙주 세포 또는 배지로부터 제1 단백질을 정제하는 단계, d) 제2 단백질을 인코딩하는 적절한 제어 서열을 갖는 DNA 벡터를 제2 숙주 세포 내로 도입하는 단계, e) 세포 또는 배지 중에서 제2 단백질을 발현시키기에 충분한 조건 하의 배지 중에서 제2 숙주 세포를 배양하는 단계, f) 숙주 세포 또는 배지로부터 제2 단백질을 정제하는 단계, 및 g) 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 사이의 결합을 가능하도록 하기에 충분한 조건 하에서 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0015] 일부 경우에, 방법은 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩타이드 사이에 디설파이드 결합의 형성을 가능하도록 하기에 충분한 조건 하에서 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하는 것을 추가로 포함한다.
- [0016] 대안적으로, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하는 방법은 a) 제1 단백질을 인코딩하는 적절한 제어 서열을 갖는 DNA 벡터 및 제2 단백질을 인코딩하는 적절한 제어 서열을 갖는 DNA 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는 것, b) 세포 또는 배지에서 단백질을 발현하고 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 사이의 회합을 가능하도록 하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하의 배지 중에서 숙주 세포를 배양하는 것, 및 c) 숙주 세포 또는 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 것에 의해 수행된다.
- [0017] 일 양태에서, 방법은 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩타이드 사이에 디설파이드 결합의 형성을 가능하도록 하기에 충분한 조건 하에서 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하는 것을 추가로 포함한다.
- [0018] a) 제1 및 제2 단백질을 인코딩하는 적절한 제어 서열을 갖는 DNA 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는 것, b) 세포 또는 배지에서 단백질을 발현하고 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 사이의 회합을 가능하도록 하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하고 폴리펩타이드 사이에 디설파이드 결합을 형성하도록 하기에 충분한 조건 하의 배지 중에서 숙주 세포를 배양하는 것, 및 c) 숙주 세포 또는 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 것을 포함하는, 가용성 융합 단백질 복합체의 제조 방법이 또한 제공된다.
- [0019] 선택적으로, 방법은 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩타이드 사이에 디설파이드 결합의 형성을 가능하도록 하기에 충분한 조건 하에서 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하는 것을 추가로 포함한다.

- [0020] 일부 경우에, 방법은 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 및/또는 임상 시약 또는 치료제로서 사용하기에 적합한 충분히 순수한 융합 단백질 복합체를 생성하기에 충분한 기타 표준 방법(바이러스 불활성화 및/또는 여과 포함)에 의한 융합 단백질 복합체의 정제를 추가로 포함한다.
- [0021] 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체의 특정 양태에서, IL-15 폴리펩타이드는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 상이한 아미노산 서열을 갖는 IL-15 변이체이다. 인간 IL-15 폴리펩타이드는 본원에서 huIL-15, hIL-15, huIL15, hIL15, IL-15 야생형(wt)으로 지칭되고, 이의 변이체는 천연 아미노산, 성숙 서열에서의 이의 위치 및 변이체 아미노산을 사용하여 지칭된다. 예를 들어, huIL15N72D는 위치 72에서 N이 D로 치환되는 것을 포함하는 인간 IL-15를 지칭한다. 일 양태에서, IL-15 변이체는, 예를 들어 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 증가된 IL-15R β γC 수용체에 대한 결합 활성으로, 입증된 바와 같이 IL-15 작용제로서 기능한다. 대안적으로, IL-15 변이체는, 예를 들어 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 감소된 IL-15R β γC 수용체에 대한 감소된 결합 활성으로 입증된 바와 같이 IL-15 길항제로서 기능한다.
- [0022] 면역 기능을 향상시키는 방법은 a) 복수의 세포를 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 복수의 세포는 IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 사슬, IL-12 도메인에 의해 인식되는 IL-12R 사슬 및/또는 IL-18 도메인에 의해 인식되는 IL-18R 사슬을 포함하는 면역 세포를 추가로 포함하는 것, 및 b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것에 의해 수행된다. 일 양태에서, 면역 기능을 향상시키는 방법은 가용성 융합 단백질 복합체에 의해 IL-15R, IL-12R 및 IL-18R 중 적어도 둘 또는 모두를 조합한 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것을 추가로 포함한다. 면역 기능을 향상시키는 예시적인 방법은 가용성 융합 단백질 복합체에 의한 IL-15R, IL-12R 및 IL-18R의 신호 전달을 통한 NK 세포의 활성화를 포함한다. 이러한 방법은 증가된 활성화 마커(즉, CD25, CD69), 병든 세포에 대한 상승된 세포독성 또는 IFN-γ의 증가된 생산을 초래하는 NK 세포의 활성화를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체에 의한 CIML NK 세포의 유도를 포함한다.
- [0023] 표적 세포를 사멸시키는 방법은 a) 복수의 세포를 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 복수의 세포는 IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 사슬, IL-12 도메인에 의해 인식되는 IL-12R 사슬 및/또는 IL-18 도메인에 의해 인식되는 IL-18R 사슬을 포함하는 면역 세포, 및 표적 질병 세포를 추가로 포함하는 것, b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것, 및 c) 활성화된 면역 세포에 의해 표적 질병 세포를 사멸시키는 것에 의해 수행된다. 일 양태에서, 방법은 가용성 융합 단백질 복합체에 의해 IL-15R, IL-12R 및 IL-18R 중 적어도 둘 또는 모두를 조합한 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것을 포함한다. 예시적인 방법은 가용성 융합 단백질 복합체에 의한 IL-15R, IL-12R 및 IL-18R의 신호 전달을 통한, NK 세포, 특히 CIML NK 세포의 활성화를 포함한다. 이러한 방법은 활성화 마커(즉, CD25, CD69), 표적 세포에 대한 상승된 세포독성을 초래하는 NK 세포의 활성화를 포함한다.
- [0024] 본 발명은 또한 a) IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 사슬, IL-12 도메인에 의해 인식되는 IL-12R 사슬 및/또는 IL-18 도메인에 의해 인식되는 IL-18R 사슬을 포함하는 면역 세포를 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체와 혼합하는 단계, b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 단계, c) 활성화된 면역 세포를 환자에게 투여(또는 입양 전달)하는 단계, 및 d) 환자의 질병을 예방하거나 치료하기에 충분한 활성화된 면역 세포를 통해 질병 세포를 손상시키거나 사멸시키는 단계를 포함하는, 환자의 질병을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 방법은 가용성 융합 단백질 복합체에 의해 IL-15R, IL-12R 및 IL-18R 중 적어도 둘 또는 모두를 조합한 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것을 포함한다. 예시적인 방법은 가용성 융합 단백질 복합체에 의한 IL-15R, IL-12R 및 IL-18R의 신호 전달을 통한, NK 세포, 특히, CIML NK 세포의 활성화를 포함한다. 방법의 다른 양태는, 전달 전에 방사선 조사될 수 있는, NK-92, aNK, haNK 또는 taNK 세포와 같은, 불멸화 면역 세포의 사용을 포함한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 환자는 입양 전달되는 세포의 이식 또는 생존을 용이하게 하기 위해 전처리되거나 전조건화된다. 전조건화의 예는 사이클로포스파미드 및 플루다라빈을 이용한 처리를 포함한다. 추가로, 환자는 세포 전달 전 및/또는 후에 입양 전달된 세포의 활성화, 생존, 또는 지속을 촉진하는 제제로 처치될 수 있다. 이러한 처치의 예는 IL-2, IL-15, ALT-803 또는 다른 면역자극제의 사용을 포함한다. 입양 세포 요법 분야에 알려진 다른 치료적 접근(즉, 동종, 자가, 훌베수동종, DLI, 줄기 세포, CAR T, NK92-기반 및 CAR NK 요법을 포함하지만 이에 한정되지 않음)이 본원의 방법에 또한 사용될 수 있다.
- [0025] a) 환자에게 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 투여하는 단계, b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 환자에서 면역 세포를 활성화시키는 단계, 및 c) 환자의 질병을 예방하거나 치료하기에 충분한 활성화된 면역 세포를 통해 질병 세포를 손상시키거나 사멸시키는 단계를 포함하는, 환자의 질병을 예방하거나 치

료하는 방법이 또한 제공된다.

- [0026] 본 발명의 융합 단백질 복합체의 투여는 대상체에서 면역 반응을 유도한다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 복합체의 투여는 신생물 또는 감염성 질병과 관련된 세포에 대한 면역 반응을 유도한다. 일 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 복합체는 면역 세포 증식, 활성화 마커, 표적 세포에 대한 세포독성, 및/또는 염증유발 사이토카인의 생산을 증가시킨다.
- [0027] 본 발명은 포유동물에게 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 유효량으로 투여함으로써 포유동물에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 포유동물에게 본 발명 중 임의의 하나의 가용성 융합 단백질 복합체를 유효량으로 투여함으로써 포유동물에서 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0028] 신생물 또는 감염성 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법은 대상체에게 유효량의 활성화된 면역 세포 또는 본원에 기재된 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물을 투여함으로써 수행된다. 예를 들어, 고형 또는 혈액 악성종양의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법은 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체에 의해 생체외에서 활성화된 CIML NK 세포를 유효량으로 대상체에게 투여함으로써 수행되며, 이로써 악성 종양을 치료한다. 예시적인 가용성 융합 단백질 복합체는 SEQ ID NO: 2 및 SEQ ID NO: 6에 및 SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0029] 본원에 기재된 방법을 이용한 치료에 적합한 신생물로는 교모세포종, 전립선암, 급성 골수성 백혈병, B-세포 신생물, 다발성 골수종, B-세포 림프종, B 세포 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 피부 T-세포 림프종, T-세포 림프종, 고형 종양, 요로상피/방광 암종, 흑색종, 폐암, 신장 세포암종, 유방암, 위 및 식도암, 두경부암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 난소암, 비-소세포 폐 암종 및 편평 세포 두경부 암종이 포함된다.
- [0030] 본원에 기재된 방법을 사용한 치료를 위한 예시적인 감염으로는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 사이토메갈로바이러스(CMV)에 의한 감염이 포함된다. 본원에 기재된 방법은 또한 박테리아 감염(예를 들어, 그램 양성 또는 그램 음성 박테리아)을 치료하는 데 유용하다(예를 들어, 참조로서 본원에 포함된, 문헌[Oleksiewicz et al. 2012. Arch Biochem Biophys. 526:124-31] 참고).
- [0031] 본 발명의 세포 요법은 유효량의 활성화된 면역 세포의 투여를 포함한다. 예를 들어, 유효량의 활성화된 NK 세포는 1×10^4 세포/kg 내지 1×10^{10} 세포/kg, 예를 들어 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 및 1×10^{10} 세포/kg, 또는 백혈구 성분채집에 의해 단리될 수 있는 양이다. 대안적으로, 활성화된 면역 세포는 고정 투여량으로 또는 신체 표면적(즉, m^2 당)에 기반하여 투여된다. 세포는 생체외 활성화 후 투여되거나 극저온 보존되고 해동(및 필요에 따라 세척) 후 투여될 수 있다.
- [0032] 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 유효량으로 투여된다. 예를 들어, 약학 조성물의 유효량은 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 예를 들어 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다. 대안적으로, 융합 단백질 복합체는 고정 투여량으로 또는 신체 표면적(즉, m^2 당)에 기반하여 투여된다.
- [0033] 융합 단백질 복합체를 포함하는 입양 전달된 면역 세포 또는 약학 조성물은 적어도 월 1회, 예를 들어 월 2회, 주 1회, 주 2회, 1 일 1회, 1 일 2회, 8 시간마다, 4 시간마다, 2 시간마다, 또는 1 시간마다 투여된다. 입양 전달된 면역 세포에 적합한 투여 방식으로는 전신 투여, 정맥내 투여, 또는 국소 투여가 포함된다. 약학 조성물에 적합한 투여 방식으로는 전신 투여, 정맥내 투여, 국소 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 종양내 투여, 흡입, 및 복강내 투여가 포함된다.
- [0034] 양태에서, 본 개시 내용은 적어도 2 개의 가용성 단백질을 포함하는 단리된 가용성 융합 단백질 복합체를 제공하며, 여기서 제1 가용성 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩타이드 도메인을 포함하고 제2 가용성 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하며, 여기서 제1 또는 제2 가용성 단백질 중 하나는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편을 추가로 포함하며, 여기서 제1 또는 제2 가용성 단백질 중 하나는 IL-12 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편을 추가로 포함하고 여기서 제1 가용성 단백질의 IL-15 도메인은 제2 가용성 단백질의 IL-15R α Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다.
- [0035] 구현예에서, IL-15 폴리펩타이드는 N72D 돌연변이를 포함하는 IL-15 변이체(IL-15N72D)이다.

- [0036] 구현예에서, IL-12 결합 도메인은 IL-12의 p40 및 p35 서브유닛을 포함한다. 구현예에서, IL-12의 p40 및 p35 서브유닛은 가요성 폴리펩타이드 링커에 의해 단일-사슬 포맷으로 연결된다.
- [0037] 구현예에서, 제1 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 2 또는 6 중 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0038] 구현예에서, 제2 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 4 또는 8 중 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0039] 구현예에서, 제1 가용성 융합 단백질 복합체는 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합으로 연결될 수 있다.
- [0040] 구현예에서, 제1 가용성 융합 단백질 복합체는 제1 가용성 융합 단백질 복합체의 Fc 도메인을 제2 가용성 융합 단백질 복합체의 Fc 도메인에 연결하는 디설파이드 결합에 의해 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합으로 연결된다.
- [0041] 구현예에서, 제1 또는 제2 가용성 단백질은 질병 항원을 인식하는 결합 도메인을 추가로 포함한다.
- [0042] 구현예에서, 제1 또는 제2 가용성 단백질은 면역 체크포인트 또는 신호 전달 분자를 인식하는 결합 도메인을 추가로 포함한다.
- [0043] 구현예에서, 질병 항원은 신생물 또는 감염성 질병과 관련된다.
- [0044] 구현예에서, 제1 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 1 또는 5 중 하나에 제시된 서열에 의해 인코딩된다. 구현예에서, 핵산 서열은 가용성 단백질을 인코딩하는 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터, 번역 개시 신호, 및 리더 서열을 추가로 포함한다.
- [0045] 구현예에서, 제2 가용성 단백질은 SEQ ID NO: 3 또는 7 중 하나에 제시된 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있다. 구현예에서, 핵산 서열은 가용성 단백질을 인코딩하는 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터, 번역 개시 신호, 및 리더 서열을 추가로 포함한다.
- [0046] 구현예에서, DNA 벡터는 상기 열거된 핵산 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있다.
- [0047] 구현예에서, 면역 기능을 향상시키는 방법으로서, a) 복수의 세포를 상기 가용성 융합 단백질 복합체 중 임의의 것과 접촉시키며, 여기서 복수의 세포는 IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 사슬, IL-12 도메인에 의해 인식되는 IL-12R 사슬 및/또는 IL-18 도메인에 의해 인식되는 IL-18R 사슬을 포함하는 면역 세포를 추가로 포함하는 것, 및 b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것을 포함하는, 방법.
- [0048] 양태에서, 본 개시 내용은 a) 복수의 세포를 상기 가용성 융합 단백질 복합체 중 임의의 것과 접촉시키며, 여기서 복수의 세포는 IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 사슬, IL-12 도메인에 의해 인식되는 IL-12R 사슬 및/또는 IL-18 도메인에 의해 인식되는 IL-18R 사슬을 포함하는 면역 세포를 추가로 포함하는 것, 및 b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것, 및 c) 활성화된 면역 세포에 의해 표적 질병 세포를 사멸시키는 것을 포함하는, 표적 세포를 사멸하는 방법을 제공한다.
- [0049] 구현예에서, 표적 세포는 종양 세포 또는 감염된 세포이다.
- [0050] 양태에서, 본 개시 내용은 a) 복수의 세포를 상기 가용성 융합 단백질 복합체 중 임의의 것과 접촉시키며, 여기서 복수의 세포는 IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 사슬, IL-12 도메인에 의해 인식되는 IL-12R 사슬 및/또는 IL-18 도메인에 의해 인식되는 IL-18R 사슬을 포함하는 면역 세포를 추가로 포함하는 것, b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것, c) 환자에게 활성화된 면역 세포를 투여(또는 입양 전달)하는 것; 및 d) 환자의 면역 반응을 향상시키는 것을 포함하는, 대상체의 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0051] 양태에서, 본 개시 내용은 a) 복수의 세포를 가용성 융합 단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 복수의 세포는 IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 사슬, IL-12 도메인에 의해 인식되는 IL-12R 사슬 및/또는 IL-18 도메인에 의해 인식되는 IL-18R 사슬을 포함하는 면역 세포를 추가로 포함하는 것, b) IL-15R, IL-12R 및/또는 IL-18R의 신호 전달을 통해 면역 세포를 활성화시키는 것, c) 환자에게 활성화된 면역 세포의 유효량을 투여(또는 입양 전달)하는 것, 및 d) 환자의 질병을 예방하거나 치료하기에 충분한 활성화된 면역 세포를 통해 질병 세포를 손상시키거나 사멸시키는 것을 포함하는, 환자의 질병을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.
- [0052] 구현예에서, 질병은 신생물 또는 감염성 질병이다.

- [0053] 양태에서, 본 개시 내용은 상기 가용성 융합 단백질 복합체 중 임의의 것의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체의 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0054] 양태에서, 본 개시 내용은 상기 가용성 융합 단백질 복합체 중 임의의 것을 포함하는 유효량의 약학 조성물을 상기 대상체에게 투여함으로써, 상기 신생물 또는 감염성 질병을 치료하는 것을 포함하는 신생물 또는 감염성 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0055] 구현예에서, 신생물은 교모세포종, 전립선암, 혈액암, B-세포 신생물, 다발성 골수종, B-세포 림프종, B 세포 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 피부 T-세포 림프종, T-세포 림프종, 고형 종양, 요로상피/방광 암종, 흑색종, 폐암, 신장 세포 암종, 유방암, 위암 및 식도암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 난소암, 비-소세포 폐 암종, 및 편평 세포 두경부 암종으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0056] 구현예에서, 면역 세포는 NK 세포 또는 사이토카인 유도된 기억 유사(CIML) NK 세포이다.
- [0057] 구현예에서, 활성화된 면역 세포의 유효량은 1×10^4 세포/kg 내지 1×10^{10} 세포/kg이다.
- [0058] 구현예에서, 면역 세포는 적어도 주 1 회 투여된다.
- [0059] 구현예에서, 유효량은 상기 융합 단백질 복합체 약 1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다.
- [0060] 구현예에서, 융합 단백질 복합체는 적어도 주 1 회 투여된다.
- [0061] 구현예에서, 융합 단백질 복합체는 면역 세포 증식, 활성화 마커, 표적 세포에 대한 세포독성, 및/또는 IFN- γ 를 포함하는, 염증유발 사이토카인의 생산을 증가시킨다.
- [0062] 바람직하게는, 융합 단백질 복합체는 인터페론 감마(IFN- γ)의 혈청 수준을 증가시키고/시키거나, CD4 $^+$ 및 CD8 $^+$ T 세포 및 NK 세포를 자극하여 대상체에서 병든 세포 또는 종양 세포를 사멸시킨다.
- [0063] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 다음의 참고 문헌은 본 발명에서 사용되는 용어 중 다수에 대한 일반적인 정의를 당업자에게 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에서 사용된 바와 같이, 다음의 용어는, 달리 명시되지 않는 한, 하기 그것들에 돌려진 의미를 갖는다.
- [0064] "제제"는 웹타이드, 핵산 분자, 또는 저분자 화합물을 의미한다.
- [0065] "TxM"은 결합 도메인에 연결된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 융합 단백질 복합체를 의미한다 (도 1a, 도 1b). 예시적인 TxM은 IL-12 및 IL-18 사이토카인에 대한 융합을 포함하는 IL-15N72D:IL-15R α Su 융합 단백질 복합체이다.
- [0066] "개선하다"는 질병의 발달 또는 진행을 감소, 억제, 약화, 축소, 정지, 또는 안정화시키는 것을 의미한다.
- [0067] "유사체"는 동일하지 않지만, 유사한 기능적 또는 구조적 특징을 갖는 분자를 의미한다. 예를 들어, 폴리펩타이드 유사체는 상응하는 천연-발생적 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 보유하는 반면, 천연 발생적 폴리펩타이드에 비해 유사체의 기능을 향상시키는 특정 생화학적 변형을 갖는다. 이러한 생화학적 변형은 변경, 예를 들어 리간드 결합 없이, 유사체의 프로테아제 저항성, 막 투과성, 또는 반감기를 증가시킬 수 있다. 유사체는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명은 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 또는 이러한 항체의 단편을 포함한다. 또한 인간화 항체와 같은 키메라 항체가 본 발명에 포함된다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 인간화는, 예를 들어 인간 항체의 상응하는 영역에 대한 설치류 상보성-결정 영역의 적어도 일부를 치환함으로써, 당업계에 기재된 방법을 사용하여, 수행될 수 있다.
- [0069] 용어 "항체" 또는 "면역글로불린"은 다클론 및 단일클론 항체 둘 모두를 포괄하는 것으로 의도된다. 바람직한 항체는 항원과 반응성인 단일클론 항체이다. 용어 "항체"는 또한 항원과 반응성인 하나 초과의 항체의 혼합물 (예를 들어, 항원과 반응성인 상이한 유형의 단일클론 항체의 각테일)을 포괄하는 것으로 의도된다. 용어 "항체"는 전체 항체, 이의 생물학적으로 기능적인 단편, 단일-사슬 항체, 및 하나 초과의 종 유래 부분을 포함

하는 키메라 항체와 같은 유전적으로 변경된 항체, 2 작용 항체, 항체 접합체, 인간화 및 인간 항체를 포함하는 것으로 추가로 의도된다. 또한 사용될 수 있는, 생물학적으로 기능적인 항체 단편은 항원에 결합하기에 충분한 항체 유래 웹타이드 단편이다. 본원에서 사용된 "항체"는 전체 항체뿐만 아니라 관심 있는 에피토프, 항원 또는 항원 단편에 결합할 수 있는 임의의 항체 단편(예를 들어, $F(ab')_2$, Fab' , Fab , Fv)을 포함하는 것으로 의도된다.

[0070] 분자"에 결합한다"는 것은 그 분자에 대한 물리화학적 친화성을 갖는 것을 의미한다.

[0071] 용어 "결합 도메인"은 항체, 단일 사슬 항체, Fab , Fv , T-세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인, 또는 당업계에 알려진 다른 항원-특이적 폴리웹타이드를 포함하는 것으로 의도된다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "생물학적 활성 폴리웹타이드" 또는 "이펙터 분자"는 본원에 논의된 원하는 효과를 생산할 수 있는 단백질, 폴리웹타이드 또는 웹타이드와 같은 아미노산 서열; 설탕 또는 다당류; 지질 또는 당지질, 당단백질, 또는 지단백질을 의미한다. 이펙터 분자는 또한 화학 제제를 포함한다. 또한 생물학적 활성 또는 이펙터 단백질, 폴리웹타이드, 또는 웹타이드를 인코딩하는 이펙터 분자 핵산이 고려된다. 따라서, 적합한 분자로는 조절 인자, 효소, 항체, 또는 약물뿐만 아니라 DNA, RNA, 및 올리고뉴클레오타이드가 포함된다. 생물학적 활성 폴리웹타이드 또는 이펙터 분자는 천연-발생적이거나 알려진 성분으로부터, 예를 들어 재조합 또는 화학적 합성에 의해, 합성될 수 있으며 이종 성분을 포함할 수 있다. 생물학적 활성 폴리웹타이드 또는 이펙터 분자는 일반적으로, 원심 분리 또는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동과 같은 표준 분자 크기 측정 기술에 의해 판단하여, 약 0.1 내지 100 KD 이상 약 1000 KD이하, 바람직하게는 약 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 내지 50 KD이다. 본 발명의 원하는 효과는, 예를 들어 결합 활성이 증가된 본 발명의 융합 단백질 복합체를 형성하고, 표적 세포를 사멸시켜, 예를 들어 질병을 예방하거나 치료하는 데 있어, 세포 증식 또는 세포 사멸을 유도하는 것, 면역 반응을 개시하거나, 진단 목적을 위한 검출 분자로서 작용하는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 검출을 위해, 예를 들어 세포를 증식시키기 위해 이를 배양하는 단계, 및 세포를 본 발명의 융합 단백질 복합체와 접촉시킨 후 융합 단백질 복합체가 추가의 세포 발생을 저해하는지 여부를 평가하는 단계의 순차적 단계를 포함하는 분석이 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명에 따라 이펙터 분자를 본 발명의 융합 단백질 복합체에 공유 결합으로 연결시키는 것은 많은 중요한 이점을 제공한다. 알려진 구조의 웹타이드를 포함하는, 단일 이펙터 분자를 함유하는 본 발명의 융합 단백질 복합체가 생산될 수 있다. 추가로, 매우 다양한 이펙터 분자가 유사한 DNA 벡터에서 생산될 수 있다. 즉, 상이한 이펙터 분자의 라이브러리가 감염되거나 병든 세포의 인식을 위해 융합 단백질 복합체에 연결될 수 있다. 또한, 치료적 적용을 위해, 본 발명의 융합 단백질 복합체를 대상체에게 투여하는 대신에, 융합 단백질 복합체를 코딩하는 DNA 발현 벡터가 융합 단백질 복합체의 생체내 발현을 위해 투여될 수 있다. 이러한 접근은 전형적으로 재조합 단백질의 제조와 관련된 고가의 정제 단계를 피하고 통상적인 접근과 관련된 항원 흡수 및 처리의 복잡성을 피한다.

[0074] 언급한 바와 같이, 본원에 개시된 융합 단백질의 성분, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 다른 생물활성 분자 및 임의의 웹타이드 링커와 같은 이펙터 분자는 융합 단백질이 의도된 기능을 갖는다면 거의 임의의 방식으로 조작될 수 있다. 특히, 융합 단백질의 각 성분은 원하는 경우 적어도 하나의 적합한 웹타이드 링커 서열에 의해 다른 성분으로부터 이격될 수 있다. 추가로, 융합 단백질은, 예를 들어 융합 단백질의 변형, 확인 및/또는 정제를 용이하게 하기 위해 태그를 포함할 수 있다. 더욱 구체적인 융합 단백질은 하기 기재된 실시예에 있다.

[0075] "검출"은 검출될 분석물의 존재, 부재 또는 양을 식별하는 것을 지칭한다.

[0076] "질병"은 세포, 조직 또는 기관의 정상적인 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 상태 또는 장애를 의미한다. 질병의 예로는 신생물 및 바이러스 감염이 포함된다.

[0077] 제형 또는 제형 성분의 "유효량" 및 "치료적 유효량"이라는 용어는, 단독으로 또는 조합하여, 원하는 효과를 제공하기에 충분한 양의 제형 또는 성분을 의미한다. 예를 들어, "유효량"은, 단독으로 또는 조합하여, 치료되지 않은 환자에 의해 질병의 증상을 개선시키는 데 필요한 화합물의 양을 의미한다. 질병의 치료적 처치를 위해 본 발명을 실시하는 데 사용되는 활성 화합물(들)의 유효량은 투여 방식, 연령, 체중, 및 대상체의 전반적인 건강에 따라 달라진다. 궁극적으로, 담당의 또는 수의사는 적절한 양 및 투약 요법을 결정할 것이다. 이러한 양은 "유효" 량이라고 지칭된다.

[0078] "단편"은 폴리웹타이드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 이 부분은, 바람직하게는, 기준 핵산 분자 또는 폴

리펩타이드의 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 함유한다. 예를 들어, 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 개 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 함유할 수 있다. 그러나, 본 발명은, 그들이 각각 전장 폴리펩타이드 및 핵산의 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 폴리펩타이드 및 핵산 단편을 또한 포함한다. 거의 모든 길이의 핵산 단편이 사용된다. 예를 들어, 약 10,000, 약 5,000, 약 3,000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50 개의 염기쌍 길이(모든 중간 길이 포함)의 총 길이를 갖는 예시적인 폴리뉴클레오타이드 절편이 본 발명의 다수의 구현에서 포함된다. 마찬가지로, 거의 모든 길이의 폴리펩타이드 단편이 사용된다. 예를 들어, 약 10,000, 약 5,000, 약 3,000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 또는 약 50 개의 아미노산 길이(모든 중간 길이 포함)의 총 길이를 갖는 예시적인 폴리펩타이드 절편이 본 발명의 다수의 구현에서 포함된다.

[0079] 용어 "단리된", "정제된", 또는 "생물학적으로 순수한"은 천연 상태에서 발견되는 바와 같이 통상적으로 수반되는 성분이 다양한 정도로 없는 물질을 지칭한다. "단리"는 원래의 공급원 또는 주변 환경으로부터의 분리의 정도를 의미한다. "정제"는 단리보다 높은 분리의 정도를 의미한다.

[0080] "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한" 단백질은 임의의 불순물이 단백질의 생물학적 특성에 실질적으로 영향을 미치거나 다른 불리한 결과를 야기하지 않도록 충분히 다른 물질이 없다. 즉, 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 때 세포 물질, 바이러스 물질, 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학 전구체 또는 다른 화학 물질이 실질적으로 없는 경우 본 발명의 핵산 또는 펩타이드는 정제된 것이다. 순도 및 균질성은 전형적으로 분석적 화학 기술, 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 용어 "정제된"은 전기 영동 겔에서 핵산 또는 단백질이 본질적으로 하나의 밴드가 생기게 하는 것을 의미할 수 있다. 변형, 예를 들어 인산화 또는 글리코실화 될 수 있는 단백질의 경우, 상이한 변형은 상이한 단리된 단백질을 야기할 수 있으며, 이는 별도로 정제될 수 있다.

[0081] 마찬가지로, "실질적으로 순수한"은 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 천연적으로 수반하는 성분으로부터 분리된, 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 전형적으로, 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드는 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 90 중량%, 95 중량%, 또는 심지어 99 중량%이고, 천연적으로 관련된 단백질 및 천연-발생적 유기 분자가 없을 때 실질적으로 순수하다.

[0082] "단리된 핵산"은 핵산이 유래된 생물의 천연-발생적 계놈에서 그 옆에 있는 유전자가 없는 핵산을 의미한다. 용어는, 예를 들어, (a) 천연 발생적 계놈 DNA 분자의 일부이지만, 그것이 천연적으로 발생하는 생물의 계놈에서 분자의 그 부분 옆에 있는 핵산 서열 둘 모두가 옆에 있지 않는 DNA; (b) 생성된 분자가 임의의 천연 발생적 백터 또는 계놈 DNA와 동일하지 않도록 하는 방식으로 백터 또는 원핵 생물 또는 진핵 생물의 계놈 DNA 내로 편입된 핵산; (c) cDNA, 계놈 단편, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 생산된 단편, 또는 제한 단편과 같은 별도의 분자; 및 (d) 하이브리드 유전자, 즉 융합 단백질을 인코딩하는 유전자의 일부인 재조합 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 핵산 분자는 합성적으로 생산된 분자뿐만 아니라 화학적으로 변경되고/되거나 변형된 백본(backbone)을 갖는 임의의 핵산을 추가로 포함한다. 예를 들어, 단리된 핵산은 정제된 cDNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드이다. 단리된 핵산 분자는 또한 메신저 리보핵산(mRNA) 분자를 포함한다.

[0083] "단리된 폴리펩타이드"는 천연적으로 수반되는 성분으로부터 분리된 본 발명의 폴리펩타이드를 의미한다. 전형적으로, 폴리펩타이드는 적어도 60 중량%이고, 천연적으로 관련된 단백질 및 천연-발생적 유기 분자가 없을 때 단리된다. 바람직하게는, 조제물은 적어도 75 중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 중량%, 및 가장 바람직하게는 적어도 99 중량%의 본 발명의 폴리펩타이드이다. 본 발명의 단리된 폴리펩타이드는, 예를 들어 천연 공급원으로부터 추출함으로써, 이러한 폴리펩타이드를 인코딩하는 재조합 핵산을 발현함으로써; 또는 단백질을 화학적으로 합성함으로써, 수득될 수 있다. 순도는 임의의 적절한 방법, 예를 들어 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동, 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0084] "마커"는 질병 또는 장애와 관련된 발현 수준 또는 활성의 변경을 갖는 임의의 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다.

[0085] "신생물"은 과도한 증식 또는 감소된 아폽토시스를 특징으로 하는 질병 또는 장애를 의미한다. 본 발명이 사용될 수 있는 예시적인 신생물로는 백혈병(예를 들어, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성적혈구증가증, 림프종(호지킨 병, 비-호지킨 병), 발덴스트롬(Waldenstrom's) 마크로글로불린혈증, 중쇄 질병, 및 육종 및 암종과 같은 고형

종양(예를 들어, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프혈관육종, 림프혈관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉(Ewing's) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭종선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장 세포 암종, 간암, 담관 암종, 융모막암종, 고환종, 배아 암종, 윌름(Wilm's) 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 교종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경 초종, 팁지교종, 슈반세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종)이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 구체적인 구현예에서, 신생물은 다발성 골수종, 베타-세포 림프종, 요로상피/방광 암종 또는 흑색종이다. "제제를 수득하는"에서와 같이 본원에서 사용된 "수득하는"은 제제를 합성, 구매, 또는 달리 획득하는 것을 포함한다.

[0086] "감소하다"는 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 100%의 음의 변경을 의미한다.

[0087] "기준"은 표준 또는 대조군 조건을 의미한다.

[0088] "기준 서열"은 서열 비교의 기초로 사용되는 정의된 서열이다. 기준 서열은 특정 서열의 서브세트, 예를 들어, 전장 cDNA 또는 유전자 서열의 단편, 또는 완전한 cDNA 또는 유전자 서열의 서브세트 또는 전체일 수 있다. 폴리펩타이드의 경우, 기준 폴리펩타이드 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 16 개 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 20 개 아미노산, 더욱 바람직하게는 적어도 약 25 개 아미노산, 및 더욱 더 바람직하게는 약 35 개 아미노산, 약 50 개 아미노산, 또는 약 100 개 아미노산일 것이다. 핵산의 경우, 기준 핵산 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 50 개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 약 60 개 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 75 개 뉴클레오타이드, 및 더욱 더 바람직하게는 약 100 개 뉴클레오타이드 또는 약 300 개 뉴클레오타이드 또는 그 부근 또는 그 사이의 임의의 정수일 것이다.

[0089] "특이적으로 결합하다"는 본 발명의 폴리펩타이드를 인식하고 결합하지만, 본 발명의 폴리펩타이드를 천연적으로 포함하는 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하고 결합하지 않는 화합물 또는 항체를 의미한다.

[0090] 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 인코딩하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 전형적으로 실질적인 동일성을 나타낼 것이다. 내인성 서열에 대한 "실질적인 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 이중-가닥 핵산 분자의 적어도 하나의 가닥과 혼성화할 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 인코딩하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 전형적으로 실질적인 동일성을 나타낼 것이다. 내인성 서열에 대한 "실질적인 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 이중-가닥 핵산 분자의 적어도 하나의 가닥과 혼성화할 수 있다. "혼성화"는 다양한 가혹 조건 하에서, 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 본원에 기재된 유전자), 또는 이들의 부분 사이에 이중-가닥 분자를 형성하는 쌍을 의미한다. (예를 들어, 문헌[Wahl, G. M. and S. L. Berger(1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R.(1987) Methods Enzymol. 152:507] 참고).

[0091] 예를 들어, 가혹 염 농도는 통상적으로 약 750 mM NaCl 및 75 mM 트리소듐 시트레이트 미만, 바람직하게는 약 500 mM NaCl 및 50 mM 트리소듐 시트레이트 미만, 더욱 바람직하게는 약 250 mM NaCl 및 25 mM 트리소듐 시트레이트 미만일 것이다. 낮은 가혹도 혼성화는 유기 용매, 예를 들어 포름아미드의 부재 하에서 획득될 수 있는 반면, 높은 가혹도 혼성화는 적어도 약 35% 포름아미드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50% 포름아미드의 존재 하에서 획득될 수 있다. 가혹 온도 조건은 통상적으로 적어도 약 30°C, 더욱 바람직하게는 적어도 약 37°C, 가장 바람직하게는 적어도 약 42°C의 온도를 포함할 것이다. 혼성화 시간, 계면활성제, 예를 들어, 소듐 도데실 설레이트(SDS),의 농도, 및 담체 DNA의 포함 또는 배제와 같은, 추가의 파라미터를 변화시키는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다. 필요에 따라 이들 다양한 조건을 조합함으로써 다양한 수준의 가혹도가 달성된다. 바람직한 구현예에서, 혼성화는 750 mM NaCl, 75 mM 트리소듐 시트레이트, 및 1% SDS에서 30°C에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 혼성화는 500 mM NaCl, 50 mM 트리소듐 시트레이트, 1% SDS, 35% 포름아미드, 및 100 μg/ml 변성 연어 정자 DNA(ssDNA)에서 37°C에서 일어날 것이다. 가장 바람직한 구현예에서, 혼성화는 250 mM NaCl, 25 mM 트리소듐 시트레이트, 1% SDS, 50% 포름아미드, 및 200 μg/ml ssDNA에서 42°C에서 일어날 것이다. 이들 조건에 대한 유용한 변형은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0092] 대부분의 적용에서, 혼성화 이후 세척 단계 또한 가혹도에 있어서 서로 다를 것이다. 세척 가혹 조건은 염 농도 및 온도에 의해 정의될 수 있다. 상기와 같이, 염 농도를 감소시키거나 온도를 증가시킴으로써 세척 가혹도가

증가될 수 있다. 예를 들어, 세척 단계에 대한 가혹 온도는 바람직하게는 약 30 mM NaCl 및 3 mM 트리소듐 시트레이트 미만, 가장 바람직하게는 약 15 mM NaCl 및 1.5 mM 트리소듐 시트레이트 미만일 것이다. 세척 단계에 대한 가혹 온도 조건은 통상적으로 적어도 약 25°C, 더욱 바람직하게는 적어도 약 42°C, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 68°C의 온도를 포함할 것이다. 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 30 mM NaCl, 3 mM 트리소듐 시트레이트, 및 0.1% SDS에서 25°C에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 트리소듐 시트레이트, 및 0.1% SDS에서 42°C에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 트리소듐 시트레이트, 및 0.1% SDS에서 68°C에서 일어날 것이다. 이들 조건에 대한 추가 변형은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 혼성화 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Benton and Davis (Science 196: 180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]에 기재되어 있다.

[0093] "실질적으로 동일한"은 기준 아미노산 서열(예를 들어, 본원에 기재된 아미노산 서열 중 임의의 하나) 또는 핵산 서열(예를 들어, 본원에 기재된 핵산 서열 중 임의의 하나)에 대해 적어도 50% 동일성을 나타내는 폴리펩타이드 또는 핵산 분자를 의미한다. 바람직하게는, 이러한 서열은 비교에 사용된 서열과 아미노산 수준 또는 핵산에서 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 80% 또는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 동일하다.

[0094] 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어(예를 들어, Sequencher, Gene Codes Corporation, 775 Technology Drive, Ann Arbor, MI; Vector NTI, Life Technologies, 3175 Staley Rd. Grand Island, NY)를 사용하여 측정된다. 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실 및/또는 다른 변형에 상동성 정도를 배정함으로써 동일하거나 유사한 서열을 매칭시킨다. 보존적 치환은 전형적으로 다음의 군 내에서의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성 정도를 결정하기 위한 예시적인 접근에서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있으며, e^{-3} 내지 e^{-100} 의 확률 점수는 밀접하게 관련된 서열임을 나타낸다.

[0095] "대상체"는 소, 말, 개, 양, 또는 고양이와 같은, 인간 또는 비-인간 포유동물을 포함하나 이에 한정되지 않는 포유동물을 의미한다. 대상체는 바람직하게는 이러한 치료를 필요로 하는 포유동물, 예를 들어 B 세포 림프종 또는 그 소인으로 진단된 대상체이다. 포유동물은 임의의 포유동물, 예를 들어 인간, 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말뿐만 아니라 음식 소비를 위해 길러진 가축 또는 동물, 예를 들어 소, 양, 돼지, 닭, 및 염소이다. 바람직한 구현예에서, 포유동물은 인간이다.

[0096] 본원에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 약기인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50으로 구성된 군으로부터의 임의의 수, 수의 조합, 또는 하위-범위를 포함하는 것으로 이해된다.

[0097] 본원에 사용된 용어 "치료하는" 및 "치료"는 불리한 상태, 장애, 또는 질병을 앓는 임상 증상이 있는 개체에게 제제 또는 제형을 투여하여, 증상의 중증도 및/또는 빈도의 감소에 영향을 미치고, 증상 및/또는 그의 근본 원인을 제거하고/하거나 손상의 개선 또는 복원을 촉진하는 것을 지칭한다. 불가능한 것은 아니지만, 장애 또는 상태를 치료하는 것은 이와 관련된 장애, 상태 또는 증상이 완전히 제거되는 것을 요구하지 않음이 이해될 것이다. 치료에 사용되는 제제 또는 제형은 세포 또는 조직을 포함할 수 있다.

[0098] 신생물을 갖는 환자의 치료는 다음 중 임의의 것을 포함할 수 있다: 초기 요법(예를 들어, 수술)에 의해 알려진 종양이 제거된 후 존재할 수 있는 잔류 종양 세포를 파괴함으로써, 가능한 암 재발을 예방하는 보조 요법(부(adjunct) 요법 또는 보조(adjunctive) 요법이라고도 함); 암을 수축시키기 위해 수술 절차 전에 제공되는 신보조 요법; 전형적으로 급성 백혈병에 대해 완화를 유발하는 유도 요법; 일단 완화가 달성되면 완화를 지속시키기 위해 제공되는 강화(consolidation) 요법(강화(intensification) 요법이라고도 함); 완화를 연장시키는 것을 돋기 위해 더 낮은 투여량 또는 더 빈번한 투여량으로 제공되는 유지 요법; 1 차 요법(표준 요법이라고도 함); 1 차 요법 후에 질병이 반응하지 않거나 재발하는 경우 제공되는 2 차(또는 3 차, 4 차 등) 요법(구제 요법이라고도 함); 암을 현저하게 감소시킬 것으로 기대하지 않고 증상 관리를 다루기 위한 고식적 요법(지지 요법이라고도 함).

[0099] 용어 "예방하는" 및 "예방"은 구체적인 불리한 상태, 장애, 또는 질병에 걸리기 쉬운 또는 그러한 성향이 있는

임상 증상이 없는 개체에게 제제 또는 조성물을 투여하는 것을 지칭하며, 따라서 증상의 발생 및/또는 그의 근본 원인의 예방에 관한 것이다.

[0100] 구체적으로 언급되거나 문맥으로부터 명백하지 않은 한, 본원에서 사용된 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해된다. 구체적으로 언급되거나 문맥으로부터 명백하지 않은 한, 본원에서 사용된 용어 "a", "an", 및 "the"는 단수 또는 복수인 것으로 이해된다.

[0101] 구체적으로 언급되거나 문맥으로부터 명백하지 않은 한, 본원에 사용된 용어 "약"은 당업계의 통상적 허용 오차 범위 내, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 내로 이해된다. 약은 명시된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 내로 이해될 수 있다. 문맥으로부터 달리 명확하지 않은 한, 본원에 제공된 모든 수치는 용어 약에 의해 수정된다.

[0102] 본원의 변수의 임의의 정의에서 화학 기의 목록의 열거는 임의의 단일 기 또는 나열된 기의 조합으로서의 그 변수의 정의를 포함한다. 본원의 변수에 대한 구현예 또는 양태의 열거는 임의의 단일 구현예로서 또는 임의의 다른 구현예 또는 이의 부분과 조합된 구현예를 포함한다.

[0103] 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 방법은 본원에 제공된 임의의 다른 조성물 및 방법 중 하나 이상과 조합될 수 있다.

[0104] "포함하는", "함유하는", 또는 "특징으로 하는"과 동의어인, 연결 용어 "포함하는"은 포괄적이거나 개방형이며 추가의, 열거되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 대조적으로, 연결구 "로 구성된"은 청구항에 특정되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 배제한다. 연결구 "로 본질적으로 구성된"은 특정된 물질 또는 단계 및 청구된 발명의 "기본 및 신규 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들"로 청구 범위를 한정시킨다.

[0105] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 바람직한 구현예의 기재, 및 청구 범위로부터 명백할 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 하기에 기재된다. 본원에 인용된 모든 공개 외국 특허 및 특허 출원은 참조로서 본원에 포함된다.

[0106] 본원에 인용된 수탁 번호로 표시된 젠뱅크(Genbank) 및 NCBI 제출물은 본원에 참조로서 포함된다. 본원에 인용된 모든 다른 공개된 참고 문헌, 문서, 원고 및 과학 문헌은 본원에 참조로서 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다. 추가로, 재료, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1a는 IL-12 및 IL-18 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 상이한 TxM 융합 단백질 복합체를 도시하는 개략도이다. 일부 경우에, 이량체 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체는 하나 또는 두 개의 IL-15N72D 융합 단백질을 포함한다. 도 1b는 IL-18 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 상이한 TxM 융합 단백질 복합체를 도시하는 개략도이다.

도 2a는 단백질 A 수지 상의 결합 및 용리 후 hIL18/IL12/TxM 단백질-함유 세포 배양 상청액의 크로마토그래피 프로파일을 나타내는 선 그래프이다. 도 2b는 조제용 크기 배제 컬럼에서 용리 후 단백질 A-정제된 hIL18/IL12/TxM 단백질의 크로마토그래피 프로파일을 나타내는 선 그래프이다. 도 2c는 분석적 크기 배제 컬럼에서 용리 후 단백질 A/SEC-정제된 hIL18/IL12/TxM 단백질의 크로마토그래피 프로파일을 나타내는 선 그래프로서, 단백질 응집체로부터 단량체 다중 단백질 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 분리를 입증한다.

도 3은 디설파이드 결합 환원 후 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 소듐 도데실 살레이트 폴리아크릴아미드 겔(4 내지 12%) 전기 영동(SDS-PAGE) 분석을 나타내는 사진이다. 좌측 레인: 씨 블루 플러스2(See Blue Plus2) 마커, 우측 레인: 단백질 A-정제된 hIL18/IL12/TxM.

도 4a는 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 결합 활성을 나타내는 선 그래프이다. 도 4b는 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한 hIL12/IL18/TxM 융합 단백질 복합체의 결합 활성을 나타내는 선 그래프이다. 도 4c는 인간 IL-15 및 인간 IL-18에 특이적인 항체에 대한 양방향(two headed) IL18/TxM 융합 단백질 복합체의 결합 활성을 나타내는 선 그래프이다. 대조군은 분석 포맷에

따라 항-CD20 TxM(2B8T2M), ALT-803 및 hIL12/IL18/TxM을 포함한다.

도 5는 ALT-803과 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 매개되는 IL-15-의존적 32D β 세포의 증식을 도시하는 선 그래프이다.

도 6은 ALT-803과 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 매개되는 IL-15-의존적 32D β 세포의 증식을 추가로 도시하는 선 그래프이다.

도 7은 IL-18과 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 매개되는 IL-18-민감성 HEK18 리포터 세포의 활성화를 추가로 도시하는 선 그래프이다.

도 8은 IL-12와 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 매개되는 IL-12-민감성 HEK12 리포터 세포의 활성화를 추가로 도시하는 선 그래프이다.

도 9a 및 도 9b는 aNK 세포에서 STAT4의 인산화를 자극하는 것에 있어서 배지 대조군(검은색 선)과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(도 9a) 또는 재조합 IL-12, IL-18 및 ALT-803의 조합(rIL12+rIL18+ALT-803)(도 9b)(빨간색 선)의 IL-12 생물학적 활성을 나타내는 선 그래프이다. 도 9c 및 도 9d는 정제된 인간 NK 세포에서 p38 MAPK의 인산화를 자극하는 것에 있어서 배지 대조군(검은색 선)과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(A) 또는 재조합 IL-12, IL-18 및 ALT-803의 조합(rIL12+rIL18+ALT-803)(B)(빨간색 선)의 IL-18 생물학적 활성을 나타내는 선 그래프이다. 도 9e 및 도 9f는 aNK 세포에서 STAT5의 인산화를 자극하는 것에 있어서 배지 대조군(검은색 선)과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(A) 또는 재조합 IL-12, IL-18 및 ALT-803의 조합(rIL12+rIL18+ALT-803)(B)(빨간색 선)의 IL-15 생물학적 활성을 나타내는 선 그래프이다.

도 10a는 aNK 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하기 위한 사이토카인 단독 또는 조합과 비교하여 hNK18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 조합된 사이토카인 면역자극 활성을 도시하는 막대 차트이다. 도 10b는 aNK 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하기 위한 ALT-803 또는 hIL18/IL12/TxM과 비교하여 양 방향 IL18/TxM 융합 단백질 복합체의 사이토카인 면역자극 활성을 도시하는 선 그래프이다.

도 11a 및 도 11b는 정제된 인간 NK 세포에 의해 CD25를 유도하는 것에 대하여 배지 대조군(검은색 선)과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(도 11a) 또는 재조합 IL-12, IL-18 및 ALT-803의 조합(rIL12+rIL18+ALT-803)(도 11b)(빨간색 선)의 생물학적 활성을 나타내는 선 그래프이다. 도 11c 및 도 11d는 정제된 인간 NK 세포에 의해 CD69를 유도하는 것에 대하여 배지 대조군(검은색 선)과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(도 11a) 또는 재조합 IL-12, IL-18 및 ALT-803의 조합(rIL12+rIL18+ALT-803)(도 11b)(빨간색 선)의 생물학적 활성을 나타내는 선 그래프이다. 도 11e 및 도 11f는 정제된 인간 NK 세포에 의해 세포내 IFN- γ 를 유도하는 것에 대하여 배지 대조군(검은색 선)과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(A) 또는 재조합 IL-12, IL-18 및 ALT-803의 조합(rIL12+rIL18+ALT-803)(B)(빨간색 선)의 생물학적 활성을 나타내는 선 그래프이다.

도 12a는 IL-18 + IL-12 + ALT-803과 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 매개되는 인간 NK 세포 표면에서의 활성화 마커 CD25의 유도를 도시하는 선 그래프이다. 도 12b는 IL-18 + IL-12 + ALT-803과 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 매개되는 인간 NK 세포의 세포내 IFN- γ 의 유도를 도시하는 선 그래프이다.

도 13a는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체(ALT-803과 비교하여)로 프라이밍한 후 ALT-803에서 휴지시킴으로써 유도되는 인간 CIML NK 세포 표면에서의 CD25의 유지를 도시하는 막대 차트이다. 도 13b는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체로(ALT-803과 비교하여) 프라이밍한 후 ALT-803에서의 휴지 및 IL-12 + ALT-803 또는 K562 백혈병 표적을 이용한 재자극에 의해 유도되는 인간 CIML NK 세포에서의 세포내 IFN- γ 의 향상된 수준을 도시하는 막대 차트이다.

도 14a는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체, 개별 사이토카인 또는 IL-18 + IL-12 + ALT-803으로 프라이밍한 후 IL-15에서의 휴지 및 IL-12 + ALT-803을 이용한 재자극에 의해 유도되는 인간 CIML NK 세포에서의 증식(CTV 회색) 및 IFN- γ 발현을 재자극이 없는 것과 비교하여 도시하는 등고선 플롯을 나타낸다. 도 14b는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체, 개별 사이토카인 또는 IL-18 + IL-12 + ALT-803으로 프라이밍한 후 ALT-803에서의 휴지 및 IL-12 + ALT-803을 이용한 재자극에 의해 유도되는 인간 CIML NK 세포에서의 증식(CTV 회색) 및 IFN- γ 발현을 재자극이 없는 것과 비교하여 도시하는 등고선 플롯을 나타낸다.

도 15는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체, 개별 사이토카인 또는 IL-18 + IL-12 + ALT-803으로 프라이밍한 후 IL-15 또는 ALT-803에서의 휴지 및 IL-12 + ALT-803을 이용한 재자극에 의해 유도되는 인간 CIML NK 세포에

서의 증식(CTV 회색)을 도시하는 히스토그램 플롯을 나타낸다.

도 16은 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체 또는 ALT-803(IL-15N72D:IL-15R α /Fc 복합체)에 의해 유도되는 MDA-MB-231 인간 유방암 세포에 대한 인간 NK 세포의 세포 독성을 도시하는 막대 차트이다.

도 17a는 ALT-803 또는 무처치와 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 매개되는 인간 NK 세포에서의 세포내 그랜자임 B의 유도를 도시하는 막대 그래프이다. 도 17b는 배지 단독 또는 ALT-803과 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체로 프라이밍한 후 조직 인자-양성 SW1990 인간 혀장 선암종 세포에 대한 인간 NK 세포의 직접적인 세포 독성(비히클 막대) 또는 항체 의존적 세포의 세포 독성(α TF Ab 막대)을 도시하는 막대 그래프이다. 도 17c는 배지 단독 또는 ALT-803과 비교하여 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체로 프라이밍한 후 항-TF Ab 또는 배지 단독(비히클)을 갖는 SW1990 인간 혀장 선암종 세포와 함께 인큐베이션된 인간 NK 세포에 의한 IFN- γ 의 발현 증가를 도시하는 막대 그래프이다.

도 18a는 hIL18/IL12/TxM(20 mg/kg) 대 PBS 투여 후 C57BL/6 마우스에서의 비장 중량의 변화를 나타내는 막대 그래프이다. 도 18b는 PBS 대조군과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(20 mg/kg)의 투여 후, C57BL/6 마우스의 비장 내 CD8 T 세포 및 NK 세포의 백분율의 변화를 나타내는 막대 그래프이다. 도 18c는 PBS 대조군과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(20 mg/kg)의 투여 후, C57BL/6 마우스의 혈액 내 절대 CD8 T 세포 및 NK 세포 수의 변화를 나타내는 막대 그래프이다. 도 18d는 PBS 대조군과 비교하여 hIL18/IL12/TxM(20 mg/kg)의 투여 후, C57BL/6 마우스의 혈액 내 CD8 T 세포 및 NK 세포의 백분율의 변화를 나타내는 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108]

자연 살해(NK) 세포 및 T 세포를 사용하는 요법은 병든 세포를 사멸시키고 염증유발 사이토카인을 방출하는 이들 세포의 능력으로 인해 암 및 바이러스 감염에 대한 잠재적 치료법으로 부상하였다(예를 들어, 문헌[Fehniger TA and Cooper MA. Trends Immunol. 2016; 37:877-888; and Cerwenka A and Lanier LL. Nat Rev Immunol. 2016 16:112-23] 참고). 오래-지속되는 비-항원-특이적 NK 세포 이팩터 기능을 나타내는, 사이토카인-유도된 기억-유사(CIML) 자연 살해(NK) 세포가 특히 관심이 있다. 이들 세포는 포화량의 인터루킨-12(IL-12, 10 ng/ml), IL-15(50 ng/ml), 및 IL-18(50 ng/ml)을 이용하여, 정제된 NK 세포를 하룻밤 동안 자극한 후 생체외에서 유도될 수 있다. 이를 프라이밍된 NK 세포는 1) 향상된 증식, 2) IL-2 수용체 α (IL-2R α , CD25), 퍼포린, 그랜자임, 및 다른 활성화 마커의 발현, 및 3) 재-자극 후 증가된 인터페론- γ (IFN- γ) 생산과 같은 기억 유사 특성을 나타낸다.

[0109]

인간을 대상으로 하는 첫 단계 1 상 임상 시험에서의 CIML NK 세포의 초기 치료적 평가는 동종이계 홀배수동종 NK 세포의 생체외 IL-12/IL-15/IL-18 자극 후에 사이클로포스파미드 및 플루다라빈으로 전조건화된 재발성 또는 불응성 급성 골수성 백혈병(AML) 환자에게 CIML NK 세포를 입양 전달하는 것을 이용하였다. 전달 후, 환자는 생체내에서 세포를 지지하기 위한 저용량 IL-2를 투여 받았다. 전달되고 프라이밍된 이들 NK 세포는 주입 후 7 내지 14 일에 빈도에 있어서 정점에 이르렀고, 전달 후 7 일에 혈액 내의 모든 NK 세포의 90% 초과를 포함하였다. 공개 시점에 평가 가능한 9 명의 환자 중, 형태학적 백혈병이 없는 상태의 1 명의 환자 외에도, 4 명이 완전히 완화되었으며, 이는 입양 전달된 CIML NK 세포에 의해 매개되는 유망한 치료적 활성을 시사한다(본원에 참조로서 포함된, 문헌[Romee, R, et al. Sci Transl Med. 2016; 8:357ra123] 참고).

[0110]

본원에 기재된 본 발명 이전에, CIML NK 세포를 생성하기 위한 최적의 방법은 완전히 해명되지 않았다. 본원에 기재된 본 발명 이전에, 전략은, 포유류 세포-생산된 사이토카인과 비교하여 글리코실화 및 잠재적으로 다른 전사-후 변형이 상이한, 재조합 인간 IL-12(곤충 세포에서 생산됨), 인간 IL-18(이. 콜라이) (*E. coli*)에서 생산됨), 및 인간 IL-15(이. 콜라이에서 생산됨)를 사용하였다. 재조합 사이토카인은 또한 상이한 순도 및 안정성을 가질 수 있고 일반적으로 임상 등급 물질로 이용 가능하지 않다. 추가로, 각각의 사이토카인은 독특한 수용체 결합, 내재화 및 재활용 특성을 가질 것으로 예상된다.

[0111]

따라서, IL-12 및 IL-18 결합 도메인을 포함하는 다중-특이적 IL-15-기반 융합 단백질 복합체가 본원에 기재된다(도 1a, 도 1b). 구체적으로, IL-12 및 IL-18 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15R α Su-Ig Fc 스캐폴드를 포함하는 융합 단백질 복합체가 본원에 기재된다. 인간 면역 세포를 사용하여 특징 확인될 때, 이들 융합 단백질 복합체는 IL-15, IL-12 및 IL-18 사이토카인 각각의 결합 및 생물학적 활성을 나타낸다. 추가로, 이들 융합 단백질 복합체는 상승된 활성화 마커, 종양 세포에 대해 증가된 세포 독성 및 IFN- γ 의 향상된 생산을 갖는 CIML NK 세포를 유도하기 위하여 작용한다. 따라서, 단일 분자로서의 융합 단백질 복합체는 NK 세포상의 다수의 사이토카인 수용체를 통해 결합하고 신호를 전달해서 이전에는 다수의 개별 사이토카인의 조합에서만 관찰된 상

승 반응을 제공한다. 추가로, 이들 융합 단백질 복합체는 Ig 분자의 Fc 영역을 포함하며, 이는 가용성 다중-폴리펩타이드 복합체를 제공하는 이량체를 형성하고, 정제 목적으로 단백질 A에 결합하고, NK 세포 및 대식세포상의 Fc γ 수용체와 상호 작용할 수 있으므로, 개별 사이토카인의 조합에 존재하지 않는 이점을 융합 단백질 복합체에 제공할 수 있다. 이들 융합 단백질 복합체를 임상 등급 물질의 대규모 생산에 적합하게 만드는 포유류 세포 발현-기반 방법이 본원에 기재된다. 본 발명의 융합 단백질 복합체에 의해 유도되는 CIML NK 세포를 제조하고 사용하기 위한 추가의 방법이 또한 제공된다.

[0112] 인터루킨-15

[0113] 인터루킨-15(IL-15)는 이펙터 NK 세포 및 CD8 $^+$ 기억 T 세포의 발달, 증식, 및 활성화를 위해 중요한 사이토카인이다. IL-15는 IL-15 수용체 α (IL-15R α)에 결합하고 이펙터 세포 상의 IL-2/IL-15 수용체 β -공통 γ 사슬(IL-15R $\beta\gamma_c$) 복합체에 트랜스(trans)로 제시된다. IL-15 및 IL-2는 IL-15R $\beta\gamma_c$ 에 대한 결합을 공유하고, STAT3 및 STAT5 경로를 통해 신호를 전달한다. 그러나, IL-2와 달리, IL-15는, 다발성 골수종에 대한 IL-2의 치료적 활성을 제한하는 것이었을 수 있는 효과인, CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$ 조절 T(Treg) 세포의 유지를 지지하거나 활성화된 CD8 $^+$ T 세포의 세포 사멸을 유도하지 않는다. 추가로, IL-15는 이펙터 CD8 $^+$ T 세포에게 항-아폽토시스 신호 전달을 제공하는 것으로 알려진 유일한 사이토카인이다. 단독으로 투여되거나 IL-15R α 와의 복합체로 투여되는 IL-15는 실험 동물 모델에서 잘-획립된 고형 종양에 대해 강력한 항-종양 활성을 나타내고, 따라서, 잠재적으로 암을 완치할 수도 있는 가장 유망한 면역치료 약물 중 하나로 확인되었다.

[0114] IL-15-기반 암 치료제의 임상 개발을 촉진하기 위해, IL-15에 비해 증가된 생물학적 활성을 갖는 IL-15 돌연변이체(IL-15N72D)가 확인되었다(Zhu et al., J Immunol, 183:3598-3607, 2009). 이 IL-15 수퍼-작용제(IL-15N72D)의 약동학 및 생물학적 활성이 IL-15N72D:IL-15R α /Fc 융합 단백질 복합체(ALT-803)의 생성에 의해 추가로 개선되어, 수퍼 작용제 복합체는 생체내 천연 사이토카인의 적어도 25 배 활성을 갖는다(Han et al., Cytokine, 56:804-810, 2011).

[0115] IL-15:IL-15R α 단백질 복합체

[0116] 전술한 바와 같이, IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체는 천연 IL-15R α 의 가용성 IL-15R α 도메인에 비-공유 결합으로 결합된 IL-15를 갖는 복합체를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, 가용성 IL-15R α 는 생물학적 활성 폴리펩타이드 및/또는 IgG Fc 도메인에 공유 결합으로 연결된다. IL-15는 IL-15 또는 제2 생물학적 활성 폴리펩타이드에 공유 결합으로 연결된 IL-15일 수 있다. IL-15:IL-15R α 단백질 복합체의 결정 구조는, 참조로서 본원에 포함된, 문헌[Chirifu et al., 2007 Nat Immunol 8, 1001-1007]에 나타나 있다.

[0117] 상기 양태 또는 본원에 기술된 본 발명의 임의의 다른 양태의 다양한 구현예에서, IL-15R α 융합 단백질은 가용성 IL-15R α , 예를 들어 생물학적 활성 폴리펩타이드(예를 들어, IgG의 중쇄 불변 도메인, IgG의 중쇄 불변 도메인의 Fc 도메인, 또는 사이토카인)에 공유 결합으로 연결된 IL-15R α 를 포함한다. 상기 양태의 본 발명의 다른 구현예에서, IL-15는 IL-15, 예를 들어 제2 생물학적 활성 폴리펩타이드, 예를 들어 사이토카인에 공유 결합으로 연결된 IL-15를 포함한다. 다른 구현예에서, 숙주 세포 또는 배지로부터 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체를 정제하는 것은 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체에 특이적으로 결합하는 친화성 시약 상에 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체를 포획하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, IL-15R α 융합 단백질은 IL-15R α /Fc 융합 단백질을 함유하고 친화성 시약은 Fc 도메인에 특이적으로 결합한다. 다른 구현예에서, 친화성 시약은 단백질 A 또는 단백질 G이다. 다른 구현예에서, 친화성 시약은 항체이다. 다른 구현예에서, 숙주 세포 또는 배지로부터 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체를 정제하는 것은 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 다른 구현예에서, 숙주 세포 또는 배지로부터 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체를 정제하는 것은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한다.

[0118] 다른 구현예에서, IL-15R α 는 IL-15R α 스시(IL-15R α Sushi, IL-15R α Su)를 포함한다. 다른 구현예에서, IL-15는 변이체 IL-15(예를 들어, IL-15N72D)이다. 다른 구현예에서, IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체의 IL-15 결합 부위는 완전히 점유된다. 다른 구현예에서, IL-15:IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체의 IL-15 결합 부위들 모두는 완전히 점유된다. 다른 구현예에서, IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체는 융합 단백질 복합체 전하 또는 크기 특성에 기반하여 정제된다. 다른 구현예에서, 완전히 점유된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체는 융합 단백질 복합체 전하 특성에 기반하여 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제된다. 다른 구현예에서, 완전히 점유된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체는 낮은 이온 강도 중성 pH 완충액을 사용하는 결합 조건 및 이온 강도가 증가하는 완충액을 사용하는 용리 조건을 갖는 4 차 아민-기반 수지를 사용하여

정제된다.

- [0119] 특정 구현예에서, 가용성 융합 단백질 복합체는 제1 및 제2 가용성 단백질을 포함하며, 여기서 제1 가용성 단백질은 IL-12 또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결된 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩타이드 도메인을 포함하고; 제2 가용성 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하며, 여기서 IL-15R α Su 도메인은 IL-12 또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결되고; 제1 가용성 단백질의 IL-15 폴리펩타이드 도메인은 제2 가용성 단백질의 IL-15R α Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다.
- [0120] 특정 구현예에서, 단리된 가용성 융합 단백질 복합체는 IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결된 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩타이드 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, IL-15 폴리펩타이드 도메인은 N72D 돌연변이(IL-15N72D)를 포함하는 IL-15 변이체이다.
- [0121] 특정 구현예에서, 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하는 단리된 가용성 융합 단백질 복합체, 여기서 IL-15R α Su 도메인은 IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결된다.
- [0123] *단리된 단백질 융합 복합체는 "양 방향(two headed)" 융합 단백질 복합체일 수 있다. 이를 복합체는, 예를 들어 IL-18/IL-15R α Su/Fc 및 IL-15N72D 융합 단백질 또는 IL-15R α Su/Fc 및 IL-18/IL-15N72D 융합 단백질(도 1b)을 포함하고, IL-15, IL-15R α Su/Fc, 인터루킨의 조합에서 다양할 수 있다. 마찬가지로, 이를 융합 단백질 복합체는 IL-12/IL-15R α Su/Fc 및 IL-15N72D 융합 단백질 또는 IL-15R α Su/Fc 및 IL-12/IL-15N72D 융합 단백질을 포함한다. 조합뿐만 아니라, 변이체, 돌연변이체, 상동체, 유사체, 변형된 분자 등을 포함하는 분자의 유형도 다양할 수 있다.
- [0124] 따라서, 특정 구현예에서, 단리된 가용성 융합 단백질 복합체는 제1 및 제2 가용성 단백질을 포함하며, 여기서 제1 가용성 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 인터루킨-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하며, 여기서 IL-15R α Su 도메인은 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 융합되고; 제2 가용성 단백질은 IL-18 도메인에 융합된 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩타이드 도메인을 포함하며; 여기서 제1 가용성 단백질의 IL-15 폴리펩타이드 도메인은 제2 가용성 단백질의 IL-15R α Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다.
- [0125] 다른 구현예에서, 단리된 가용성 융합 단백질 복합체는 제1 및 제2 가용성 단백질을 포함하며, 여기서 제1 가용성 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 인터루킨-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하며, 여기서 IL-15R α Su 도메인은 IL-12 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 융합되고; 제2 가용성 단백질은 IL-12 도메인에 융합된 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩타이드 도메인을 포함하며; 여기서 제1 가용성 단백질의 IL-15 폴리펩타이드 도메인은 제2 가용성 단백질의 IL-15R α Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다.
- [0126] 특정 구현예에서, 단리된 가용성 융합 단백질은 인터루킨-15 폴리펩타이드 도메인, 제1 및 제2 가용성 단백질을 포함하며 여기서 제1 가용성 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 인터루킨-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하며, 여기서 IL-15R α Su 도메인은 IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결되고 제2 가용성 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 인터루킨-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하며, 여기서 IL-15R α Su 도메인은 IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결되고, 여기서 IL-15 폴리펩타이드 도메인은 제1 및 제2 가용성 단백질의 IL-15R α Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다.
- [0127] 또 다른 구현예에서, 단리된 가용성 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 인터루킨-15 수용체 알파 스시-결합 도메인(IL-15R α Su), 제1 및 제2 가용성 단백질을 포함하며 여기서 제1 가용성 단백질은 IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결된 인터루킨-15 폴리펩타이드 도메인을 포함하고 제2 가용성 단백질은 IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인 또는 이의 기능적 단편에 연결된 인터루킨-15 폴리펩타이드 도메인을 포함하며, 여기서, 제1 및/또는 제2 가용성 단백질의 IL-15 폴리펩타이드 도메인은 IL-15R α Su 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다.
- [0128] 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체의 특정 구현예에서, IL-15 폴리펩타이드는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 상이한 아미노산 서열을 갖는 IL-15 변이체이다. 인간 IL-15 폴리펩타이드는 본원에서 huIL-15, hIL-15, huIL15, hIL15, IL-15 야생형(wt)으로 지칭되고 이의 변이체는 천연 아미노산, 성숙 서열에서의 이의 위치 및 변이체 아

미노산을 사용하여 지칭된다. 예를 들어, huIL15N72D는 위치 72에서 N이 D로 치환되는 것을 포함하는 인간 IL-15를 지칭한다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여, 예를 들어 IL-15R $\beta\gamma$ C 수용체에 대한 증가된 결합 활성으로, 입증된 바와 같이 IL-15 작용제로서 기능한다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여, 예를 들어 IL-15R $\beta\gamma$ C 수용체에 대한 감소된 결합 활성으로, 입증된 바와 같이 IL-15 길항제로서 기능한다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 IL-15R $\beta\gamma$ C 수용체에 대한 증가된 결합 친화도 또는 감소된 결합 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체의 서열은 천연 IL-15 서열과 비교하여 적어도 하나(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상)의 아미노산 변화를 갖는다. 아미노산 변화는 IL-15R β 및/또는 IL-15R γ C와 상호 작용하는 IL-15의 도메인에서의 하나 이상의 아미노산 치환 또는 결실을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 아미노산 변화는 성숙한 인간 IL-15 서열의 위치 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, 또는 111에서의 하나 이상의 아미노산 치환 또는 결실이다. 예를 들어, 아미노산 변화는 성숙한 인간 IL-15 서열의 위치 8에서 D를 N 또는 A로, 위치 61에서 D를 A로, 위치 65에서 N을 A로, 위치 72에서 N에서 R로 또는 위치 108에서 Q를 A로 치환하는 것, 또는 이를 치환의 임의의 조합이다. 특정 구현예에서, 아미노산 변화는 성숙한 인간 IL-15 서열의 위치 72에서 N을 D로 치환한 것이다.

[0129] ALT-803

[0130] ALT-803은 IL-2R $\beta\gamma$ 에 결합하는 능력이 증가되고 생물학적 활성이 향상된 IL-15 돌연변이체를 포함한다(미국 특허 번호 8,507,222, 본원에 참조로서 포함됨). IL-15의 이 수퍼-작용제 돌연변이체는 간행물(Zu et al., 2009 J Immunol, 183:3598-3607, 본원에 참조로서 포함됨)에 기재되어 있다. 가용성 IL-15 α 수용체 융합 단백질(IL-15R α Su/Fc)과 조합된 이 IL-15 수퍼-작용제는 시험관내에서 그리고 생체내에서 매우 강력한 IL-15 활성을 갖는 융합 단백질 복합체를 초래한다(Han et al., 2011, Cytokine, 56:804-810; Xu, et al., 2013 Cancer Res. 73:3075-86, Wong, et al., 2013, Oncolmmunology 2:e26442). IL-15 수퍼 작용제 복합체는 IL-15 수용체 α /IgG1 Fc 융합 단백질에 결합된 IL-15 돌연변이체(IL-15N72D)를 포함하고(IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc) "ALT-803"으로 지칭된다.

[0131] 약동학적 분석은 융합 단백질 복합체가 마우스에서 정맥내 투여 후 25 시간의 반감기를 가짐을 나타내었다. ALT-803은 면역적격 마우스에서 공격적인 고형 및 혈액 종양 모델에 대해 인상적인 항-종양 활성을 나타낸다. 주 2 회 또는 주 1 회 정맥내 투약 요법을 사용하여 단독 요법으로 투여되거나 항체와 조합된 요법으로 투여될 수 있다. ALT-803 항-종양 반응은 또한 지속성이 있다. ALT-803 처리 후 완치된 종양-보유 마우스는 또한 동일한 종양 세포를 이용한 재-도전에 대해 매우 저항성이 있었으며, 이는 ALT-803이, 재-도입된 종양 세포에 대한 효과적인 면역 기억 반응을 유도함을 시사한다.

[0132] ALT-803(이량체 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질과 회합된 IL-15N72D) 서열은 SEQ ID NO: 9를 포함한다:

[0133] *IL-15N72D 단백질 서열(리더 펩타이드 포함)*

[0134] METDTLLLWVLLWVPGSTG-

[0135] [리더 펩타이드]

[0136] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLLELQVISLESGDAS
IHDTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFIINTS

[0137] [*IL-15N72D*]

[0138] *IL-15R α Su/Fc 단백질 서열(리더 펩타이드 포함)*

[0139] MDRLTSSFLLLIVPAYVLS-

[0140] [리더 펩타이드]

[0141] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT
TPSLKCIR-

[0142] [*IL-15R α Su*]

[0143] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKA
LPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSPDIAVEWESNG
OPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

[0144] [IgG1 CH2--CH3(Fc 도메인)]

IL-12

IL-12는 IL-12, IL-23, IL-27 및 IL-35로 구성되는 사이토카인 패밀리의 구성원으로, 이는 다양한 기능을 가지며 염증유발 및 항-염증 반응 모두에서 역할을 한다. IL-12는 전형적으로 활성화된 항원 제시 세포(APC)에 의해 발현된다. IL-12는 T 세포에 의한 Th1 분화 및 IFN- γ 생산을 촉진하고, 항-종양 반응의 유도에 역할을 한다. 본원에 기재된 바와 같이, IL-15 및 IL-18과 조합된 IL-12는 CIML NK 세포를 유도할 수 있다.

IL-12는 α 서브유닛(p35) 및 β 서브유닛(p40)으로 구성된 디설파이드-연결된 이종이량체이며 여기서 α 서브유닛은 4-나선 다발 장쇄 사이토카인으로 구성되고 β 서브유닛은 IL-6 패밀리의 비-신호 전달 수용체와 상동이다. IL-12의 결정 구조 및 돌연변이 유발 분석은 서브유닛 상호 작용에 중요한 p35/p40 계면의 아미노산 잔기를 정의하였다(Yoon, et al. .2000, EMBO J. 9, 3530-354). 예를 들어, p35의 핵심 아르기닌 잔기(R189)는 p40의 아스파르트산(D290)과 상호 작용하여, R189 측쇄가 p40 상의 친수성 포켓 내에 묻힌다. 추가로, p40의 형태 변화는 이를 상호 작용을 최적화하는 데 중요할 수 있다. 이 정보에 기반하여, 개선된 서브유닛 상호 작용을 나타내는 아미노산 변화를 함유하는 IL-12 변이체가 생성될 수 있다. 더욱이, p40의 N-말단에 연결된 p35의 C-말단 또는 그 반대를 통해, 유연한 링커에 의해 p40 서브유닛에 연결된 p35 서브유닛으로 구성된 IL-12의 단일-사슬 형태가 생성될 수 있다. 이러한 변이체는 본 발명의 융합 단백질 복합체로 편입되어 IL-12 결합 도메인의 발현, 서브유닛 상호 작용 및/또는 안정성을 최적화할 수 있다. 마찬가지로, IL-12 유전자 및 발현 작제물은 유전자 발현, 번역, 번역 후 변형 및/또는 분비를 개선하기 위해 변형(즉, 코돈 최적화, 이차 구조의 제거)될 수 있다.

IL-12의 작용은 2 개의 서브유닛(IL-12R β 1 및 IL-12R β 2)으로 구성된 막 관통 수용체에 결합함으로써 매개된다. 수용체의 각 서브유닛은 세포의 리간드-결합 도메인, 막 관통 도메인 및 야누스(Janus)-패밀리 티로신 키나제의 결합을 매개하는 시토졸 도메인으로 구성된다. IL-12 결합은 β 1 및 β 2의 이종이량체화 및 신호 전달이 가능한 고-친화성 수용체 복합체의 생성을 초래하는 것으로 여겨진다. 이 모델에서, 수용체의 이량체화는 시토졸 도메인의 병치 및 후속 티로신 인산화 및 수용체-관련된 야누스-패밀리 키나제, Jak2 및 Tyk-2의 활성화로 이어진다. 이를 활성화된 키나제는, 차례로, 티로신 인산화하고 신호 전달제 및 전사 활성화제(STAT) 패밀리(STAT-1, -3 및 -4)의 몇몇 구성원을 활성화시킨다. STAT는 핵으로 이동하여, IFN- γ 를 포함하는 몇몇 면역-반응성 유전자의 전사를 활성화시킨다. IL-12:IL-12R 복합체의 결정 구조는 아직 결정되지 않았지만, 수용체 결합/신호 전달 활성이 증가된 IL-12 변이체는 표준 스크리닝 분석에 의해 단리될 수 있다(Leong et al. 2003, PNAS 100:1163-1168). p35 서브유닛만을 포함하는, IL-12 이종이량체의 단편은 생물학적 활성을 나타낼 수 있다. IL-12/IL-12R 표면 체류 시간, 회전율 및/또는 재활용을 변형하는 IL-12 변이체 또한 단리될 수 있다. 더욱이, IL-12 변이체는 본 발명의 융합 단백질 복합체로 편입되어, 면역 세포 반응, 특히 CIML NK 세포 활성을 유도하는 조합된 사이토카인 활성을 최적화하고/하거나 조합된 사이토카인 활성의 균형을 맞출 수 있다.

IL-18

인터루킨 18(IL-18)은 선천성 및 후천성 면역 반응의 조절에 관여하는 다면발현성 IL-1 수퍼패밀리 사이토카인이다. IL-12 또는 IL-15의 환경에서, IL-18은 NK 세포 및 CD4 T 헬퍼(Th) 1 럼프구에서 IFN- γ 의 강력한 유도제이다. 그러나, IL-18은 또한 숙주 미세 환경-의존적 방식으로, Th2 및 Th17 세포 반응뿐만 아니라, CD8 세포 독성 세포 및 호중구의 활성을 조절한다. IL-18의 생물학적 활성은 T 세포, NK 세포, 대식세포, 호중구, 및 내피 세포 상에서 발현되는 이종이량체 IL-18R α / β 복합체에의 결합에 의해 매개되어 NF- κ B의 활성화로 이어지는 다운스트림 신호를 유도한다. 또한, IL-18의 활성은, IL-18에 대한 세포 표면 수용체와 경쟁하고 IL-18 활성을 중화시키는, 고-친화성의, 구성적으로 발현되고, 순환하는 IL-18 결합 단백질(IL-18BP)의 수준에 의해 조절될 수 있다. IL-18BP와의 상호 작용을 감소시키고/시키거나 IL-18R α / β 복합체의 결합/신호 전달을 증가시키는 IL-18의 변이체(예를 들어, 아미노산 돌연변이/결실 포함)는 IL-18 활성을 향상시키는 데 유용할 수 있다. 이러한 변이체의 식별은 표준 스크리닝 분석을 통해 이루어질 수 있다(Kim et al. 2001, PNAS 98:3304-3309). IL-18의 단편은 생물학적 활성을 나타낼 수 있다. IL-18/IL-18R 표면 체류 시간, 회전율 및/또는 재활용을 변형시키는 IL-18 변이체 또한 단리될 수 있다. 이러한 IL-18 변이체는 본 발명의 융합 단백질 복합체로 편입되어, 면역 세포 반응, 특히 CIML NK 세포 활성을 유도하는 IL-18 활성을 최적화하고/하거나 조합된 사이토카인 활성의 균형을 맞출 수 있다. 또한, IL-18 변이체는 본 발명의 융합 단백질 복합체에 편입되어 IL-18 결합 도메인의 발현 및/또는 안정성을 최적화할 수 있다. 마찬가지로, IL-18 유전자 및 발현 작제물은 유전자 발현, 번역, 번역 후 변형 및/또는 분비를 개선하기 위해 변형(즉, 코돈 최적화, 이차 구조의 제거)될 수 있다.

항원-특이적 결합 도메인

[0151] 항원-특이적 결합 도메인은 병든 세포 상의 표적에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드로 구성된다. 대안적으로, 이들 도메인은 종양 성장을 지지하는 기질 세포 상의 표적 또는 질병-매개 면역 억제를 지지하는 면역 세포 상의 표적과 같이, 질병 상태를 지지하는 다른 세포 상의 표적에 결합할 수 있다. 항원-특이적 결합 도메인으로는 항체, 단일 사슬 항체, Fab, Fv, T-세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인, 도메인 항체, 단일 도메인 항체, 미니바디, 나노바디, 웨티바디, 또는 당업계에 알려진 다양한 다른 항체 모방체(예를 들어, 아페머(affimer), 아페틴(affitin), 알파바디, 아트리머(atrimer), CTLA4-기반 분자, 아드넥틴(adnectin), 안티칼린(anticalin), 쿠니츠(Kunitz) 도메인-기반 단백질, 아비머(avimer), 노턴(knottin), 피노머(fynomeric), 다르핀(darpin), 아페바디(affibody), 아필린(affilin), 모노바디 및 아르마딜로 반복 단백질-기반 단백질(Weidle, UH, et al. 2013. Cancer Genomics & Proteomics 10:155-168))가 포함된다.

[0153] 특정 구현예에서, 항원-특이적 결합 도메인에 대한 항원은 세포 표면 수용체 또는 리간드를 포함한다. 추가의 구현예에서, 항원은 CD 항원, 사이토카인 또는 케모카인 수용체 또는 리간드, 성장 인자 수용체 또는 리간드, 조직 인자, 세포 부착 분자, MHC/MHC-유사 분자, Fc 수용체, 톤(Toll)-유사 수용체, NK 수용체, TCR, BCR, 양성/음성 동시-자극 수용체 또는 리간드, 사멸 수용체 또는 리간드, 종양 관련 항원, 또는 바이러스 인코딩 항원을 포함한다.

[0154] 바람직하게는, 항원-특이적 결합 도메인은 종양 세포 상의 항원에 결합할 수 있다. 종양-특이적 결합 도메인은 리툭시맙(rituximab), 오파투무맙(ofatumumab), 및 오비누투주맙(obinutuzumab, 항-CD20 Ab); 트라스투주맙(trastuzumab) 및 페투주맙(pertuzumab, 항-HER2 Ab); 세툭시맙(cetuximab) 및 파니투무맙(panitumumab, 항-EGFR Ab); 및 알렘투주맙(alemtuzumab, 항-CD52 Ab)을 포함하는, 암 환자의 치료를 위해 승인된 항체로부터 유래될 수 있다. 마찬가지로, CD20(⁹⁰Y-표지된 이브리투모맙 티وخ세탄(ibritumomab tiuxetan), ¹³¹I-표지된 토시투모맙(tositumomab)), HER2(아도-트라스투주맙 엠탄신(ado-trastuzumab emtansine)), CD30(브렌툭시맙 베도틴(brentuximab vedotin)) 및 CD33(젬투주맙 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin))에 특이적인 승인된 항체-이펙터 분자 접합체로부터의 결합 도메인(Sliwkowski MX, Mellman I. 2013 Science 341:1192)이 사용될 수 있다.

[0155] 추가로, 본 발명의 바람직한 결합 도메인은 당업계에 알려진 다양한 다른 종양-특이적 항체 도메인을 포함할 수 있다. 암 치료를 위한 항체 및 이들의 각 표적으로는 니볼루맙(nivolumab, 항-PD-1 Ab), TA99(항-gp75), 3F8(항-GD2), 8H9(항-B7-H3), 아바고보맙(abagovomab, 항-CA-125(모방)), 아데카투무맙(adecatumumab, 항-EpCAM), 아푸투주맙(afutuzumab, 항-CD20), 알라시주맙(alacizumab) 폐골(항-VEGFR2), 알투모맙(altumomab) 펜테테이트(항-CEA), 아마툭시맙(amatuximab, 항-메소텔린), AME-133(항-CD20), 아나투모맙 마페나톡스(anatumomab mafenatox, 항-TAG-72), 아폴리주맙(apolizumab, 항-HLA-DR), 아르시투모맙(arcitumomab, 항-CEA), 바비툭시맙(bavituximab, 항-포스파티딜세린), 베투모맙(bectumomab, 항-CD22), 벨리무맙(belimumab, 항-BAFF), 베실레소맙(besilesomab, 항-CEA-관련 항원), 베바시주맙(bevacizumab, 항-VEGF-A), 비바투주맙 메르탄신(bivatuzumab mertansine, 항-CD44 v6), 블리나투모맙(blinatumomab, 항-CD19), BMS-663513(항-CD137), 브렌툭시맙 베도틴(항-CD30(TNFRSF8)), 칸투주맙(cantuzumab) 메르탄신(항-뮤신 CanAg), 칸투주맙 라브탄신(ravtansine)(항-MUC1), 카프로맙(capromab) 펜데티드(항-전립선 암종 세포), 카를루맙(carlumab, 항-MCP-1), 카투막소맙(catumaxomab, 항-EpCAM, CD3), cBR96-독소루비신 면역접합체(항-루이스(Lewis)-Y 항원), CC49(항-TAG-72), 세렐리주맙(cedelizumab, 항-CD4), Ch.14.18(항-GD2), ch-TNT(항-DNA 관련 항원), 시타투주맙 보가톡스(citatumumab bogatox, 항-EpCAM), 식수투무맙(cixutumumab, 항-IGF-1 수용체), 클리바투주맙 테트락세탄(clivatuzumab tetraxetan, 항-MUC1), 코나투무맙(conatumumab, 항-TRAIL-R2), CP-870893(항-CD40), 다세투주맙(dacetuzumab, 항-CD40), 다클리주맙(daclizumab, 항-CD25), 달로투주맙(dalotuzumab, 항-인슐린-유사 성장 인자 I 수용체), 다라투무맙(daratumumab, 항-CD38(사이클릭 ADP 리보스 하이드롤라제)), 템시주맙(demcizumab, 항-DLL4), 테투모맙(detumomab, 항-B-림프종 세포), 드로지투맙(drozitumab, 항-DR5), 둘리고투맙(duligotumab, 항-HER3), 두시지투맙(dusigitumab, 항-ILGF2), 에크로멕시맙(ecromeximab, 항-GD3 강글리오사이드), 에드레콜로맙(edrecolomab, 항-EpCAM), 엘로투주맙(elotuzumab, 항-SLAMF7), 엘실리모맙(elsilimomab, 항-IL-6), 에나바투주맙(enavatuzumab, 항-TWEAK 수용체), 에노티쿠맙(enotucumab, 항-DLL4), 엔시툭시맙(ensituximab, 항-5AC), 에피투모맙 시툭세탄(epitumomab cituxetan, 항-에피시알린), 에프라투주맙(epratuzumab, 항-CD22), 에르투막소맙(ertumaxomab, 항-HER2/neu, CD3), 에타라시주맙(etaracizumab, 항-인테그린 α v β3), 파랄리모맙(faralimomab, 항-인터페론 수용체), 파를레투주맙(farletuzumab, 항-플레이트 수용체 1), FBTA05(항-CD20), 피클라투주맙(ficlatuzumab, 항-HGF), 피지투무맙(figitumumab, 항-IGF-1 수용체), 플란보투맙(flanvotumab, 항-TYRP1(당단백질 75)), 프레솔리무맙(fresolimumab, 항-TGFβ), 푸툭시맙

(futuximab, 항-EGFR), 갈릭시맙(galiximab, 항-CD80), 가니투맙(ganitumab, 항-IGF-I), 챔투주맙 오조가미신(항-CD33), 지렌특시맙(girentuximab, 항-탄산 탈수효소 9(CA-IX)), 글렘바투무맙(glembatumumab) 베도틴(항-GPNMB), 구셀쿠맙(guselkuab, 항-IL13), 이발리주맙(ibalizumab, 항-CD4), 이브리투모맙 티옥세탄(ibrutumomab tiuxetan, 항-CD20), 이크루쿠맙(icrucumab, 항-VEGFR-1), 이고보맙(igovomab, 항-CA-125), IMAB362(항-CLDN18.2), IMC-CS4(항-CSF1R), IMC-TR1(TGF β RII), 임가투주맙(imgatuzumab, 항-EGFR), 인클라ку맙(inclacumab, 항-셀렉틴 P), 인다톡시맙(indatuximab) 라브탄신(항-SDC1), 이노투주맙(inotuzumab) 오조가미신(항-CD22), 인테투무맙(intetumumab, 항-CD51), 이필리무맙(ipilimumab, 항-CD152), 이라투무맙(iratumumab, 항-CD30(TNFRSF8)), KM3065(항-CD20), KW-0761(항-CD194), LY2875358(항-MET) 라베투주맙(labetuzumab, 항-CEA), 람브롤리주맙(lambrolizumab, 항-PDCD1), 렉사투무맙(lexatumumab, 항-TRAIL-R2), 린투주맙(lintuzumab, 항-CD33), 리릴루맙(lirilumab, 항-KIR2D), 로르보투주맙(lorvotuzumab) 메르탄신(항-CD56), 루카투무맙(lucatumumab, 항-CD40), 루밀릭시맙(lumiliximab, 항-CD23(IgE 수용체)), 마파투무맙(mapatumumab, 항-TRAIL-R1), 마르제톡시맙(margetuximab, 항-ch4D5), 마투주맙(matuzumab, 항-EGFR), 마브릴리무맙(mavrilimumab, 항-GMCSF 수용체 α -사슬), 밀라투주맙(milatuzumab, 항-CD74), 민레투모맙(minretumomab, 항-TAG-72), 미투모맙(mitumomab, 항-GD3 강글리오사이드), 모가뮬리주맙(mogamulizumab, 항-CCR4), 목세투모맙 파수도톡스(moxetumomab pasudotox, 항-CD22), 나콜로맙 타페나톡스(nacolomab tafenatox, 항-C242 항원), 납투모맙 에스타페나톡스(naptumomab estafenatox, 항-5T4), 나르나투맙(narnatumab, 항-RON), 네시투무맙(necitumumab, 항-EGFR), 네스바쿠맙(nesvacumab, 항-엔지오포이에틴 2), 니모투주맙(nimotuzumab, 항-EGFR), 니볼루맙(항-IgG4), 노페투모맙 메르펜탄(nofetumomab merpantan), 오크렐리주맙(ocrelizumab, 항-CD20), 오카라투주맙(ocaratuzumab, 항-CD20), 올라라투맙(olaratumab, 항-PDGF-R α), 오나르투주맙(onartuzumab, 항-c-MET), 온특시주맙(ontuzumab, 항-TEM1), 오포르투주맙 모나톡스(oportuzumab monatox, 항-EpCAM), 오레고보맙(oregovomab, 항-CA-125), 오틀레르투주맙(otlertuzumab, 항-CD37), 판코맙(pankomab, MUC1의 항-종양 특이적 글리코실화), 파르사투주맙(parsatuzumab, 항-EGFL7), 파스콜리주맙(pascolizumab, 항-IL-4), 파트리투맙(patritumab, 항-HER3), 펌투모맙(pemtumomab, 항-MUC1), 퍼투주맙(pertuzumab, 항-HER2/neu), 피딜리주맙(pidilizumab, 항-PD-1), 피나투주맙(pinatuzumab) 베도틴(항-CD22), 편투모맙(pintumomab, 항-선암종 항원), 폴라투주맙(polatuzumab) 베도틴(항-CD79B), 프리투무맙(pratumumab, 항-비멘틴), PR0131921(항-CD20), 퀼리주맙(quilizumab, 항-IGHE), 라코투모맙(racotumomab, 항-N-글리콜릴뉴라민산), 라드레투맙(radretumab, 항-피브로네틴 엑스트라 도메인-B), 라무시루맙(ramucirumab, 항-VEGFR2), 릴로투무맙(rilotumumab, 항-HGF), 로바투무맙(robatumumab, 항-IGF-1 수용체), 롤레두맙(roledumab, 항-RHD), 로벨리주맙(rovelizumab, 항-CD11&CD18), 사말리주맙(samalizumab, 항-CD200), 사투모맙(satumomab) 웬데티드(항-TAG-72), 세리반투맙(seribantumab, 항-ERBB3), SGN-CD19A(항-CD19), SGN-CD33A(항-CD33), 시브로투주맙(sibrotuzumab, 항-FAP), 실특시맙(siltuximab, 항-IL-6), 솔리토맙(solitomab, 항-EpCAM), 손투주맙(sontuzumab, 항-에피시알린), 타발루맙(tabalumab, 항-BAFF), 타카투주맙(tacatumab) 테트락세탄(항-알파-태아 단백질), 타플리투모맙 팝톡스(taplitumomab paptox, 항-CD19), 텔리모맙 아리톡스(telimomab aritox), 테나투모맙(tenatumomab, 항-테나신 C), 테넬릭시맙(teneliximab, 항-CD40), 테프로투무맙(teprotumumab, 항-CD221), TGN1412(항-CD28), 티실리무맙(ticilimumab, 항-CTLA-4), 티가투주맙(tigatuzumab, 항-TRAIL-R2), TNX-650(항-IL-13), 토시투모맙(tositumomab, 항-CS20), 토베투맙(tovetumab, 항-CD140a), TRBS07(항-GD2), 트레갈리주맙(tregalizumab, 항-CD4), 트레멜리무맙(tremelimumab, 항-CTLA-4), TRU-016(항-CD37), 투코투주맙 셀모루킨(tucotuzumab celmoleukin, 항-EpCAM), 유블리특시맙(ublituximab, 항-CD20), 유렐루맙(urelumab, 항-4-1BB), 반턱투맙(vantictumab, 항-프리즐드(Frizzled) 수용체), 바팔리시맙(vapaliximab, 항-AOC3(VAP-1)), 바텔리주맙(vatelizumab, 항-ITGA2), 벨투주맙(veltuzumab, 항-CD20), 베센쿠맙(vesencumab, 항-NRP1), 비실리주맙(visilizumab, 항-CD3), 볼로식시맙(volociximab, 항-인테그린 $\alpha 5\beta 1$), 보르세투주맙 마포도틴(vorsetuzumab mafodotin, 항-CD70), 보투무맙(votumumab, 항-종양 항원 CTAA16.88), 잘루투무맙(zalutumumab, 항-EGFR), 자놀리무맙(zanolimumab, 항-CD4), 자톡시맙(zatuximab, 항-HER1), 자랄리무맙(ziralimumab, 항-CD147(바시진(basigin))), RG7636(항-ETBR), RG7458(항-MUC16), RG7599(항-NaPi2b), MPDL3280A(항-PD-L1), RG7450(항-STEAP1), 및 GDC-0199(항-Bcl-2)가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0156] 본 발명에서 유용한 다른 항체 도메인 또는 종양 표적 결합 단백질(예를 들어, TCR 도메인)은 다음 항원에 결합하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다(표시된 암 적응증은 비-제한적 예를 나타냄): 아미노펩티다제 N(CD13), 아넥신 A1, B7-H3(CD276, 다양한 암), CA125(난소암), CA15-3(암종), CA19-9(암종), L6(암종), 루이스 Y(암종), 루이스 X(암종), 알파 태아 단백질(암종), CA242(결장직장암), 태반 알칼리 포스파타제(암종), 전립선 특이 항원(전립선), 전립선 산 포스파타제(전립선), 표피 성장 인자(암종), CD2(호지킨 병, NHL 림프종,

다발성 골수종), CD3 엡실론(T 세포 림프종, 폐암, 유방암, 위암, 난소암, 자가 면역 질병, 악성 복수), CD19(B 세포 악성 종양), CD20(비-호지킨 림프종, B-세포 신생물, 자가 면역 질병), CD21(B-세포 림프종), CD22(백혈병, 림프종, 다발성 골수종, SLE), CD30(호지킨 림프종), CD33(백혈병, 자가 면역 질병), CD38(다발성 골수종), CD40(림프종, 다발성 골수종, 백혈병(CLL)), CD51(전이성 흑색종, 육종), CD52(백혈병), CD56(소세포 폐암, 난소암, 메르켈(Merkel) 세포 암종, 및 액체 종양, 다발성 골수종), CD66e(암종), CD70(전이성 신장 세포 암종 및 비-호지킨 림프종), CD74(다발성 골수종), CD80(림프종), CD98(암종), CD123(백혈병), 뮤신(암종), CD221(고형 종양), CD227(유방, 난소암), CD262(NSCLC 및 기타 암), CD309(난소암), CD326(고형 종양), CEACAM3(결장직장암, 위암), CEACAM5(CEA, CD66e)(유방, 결장직장암 및 폐암), DLL4(A-유사-4), EGFR(다양한 암), CTLA4(흑색종), CXCR4(CD184, 혈액-종양, 고형 종양), 엔도글린(CD105, 고형 종양), EPCAM(상피 세포 부착 분자, 방광, 두부, 경부, 결장, NHL 전립선, 및 난소 암), ERBB2(폐, 유방, 전립선암), FCGR1(자가 면역 질병), FOLR(플레이트 수용체, 난소암), FGFR(암종), GD2 강글리오사이드(암종), G-28(세포 표면 항원 당지질, 흑색종), GD3 이디오타입(암종), 열 충격 단백질(암종), HER1(폐암, 위암), HER2(유방, 폐암 및 난소암), HLA-DR10(NHL), HLA-DRB(NHL, B 세포 백혈병), 인간 융모 생식선 자극 호르몬(암종), IGF1R(고형 종양, 혈액 암), IL-2 수용체(T-세포 백혈병 및 림프종), IL-6R(다발성 골수종, RA, 캐슬맨(Castleman's) 병, IL6 의존성 종양), 인테그린($\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 11 \beta 3$, $\alpha 5 \beta 5$, $\alpha v \beta 5$, 다양한 암에 대해), MAGE-1(암종), MAGE-2(암종), MAGE-3(암종), MAGE 4(암종), 항-트랜스페린 수용체(암종), p97(흑색종), MS4A1(막-스페닝(spanning) 4-도메인 서브페밀리 A 구성원 1, 비-호지킨 B 세포 림프종, 백혈병), MUC1(유방암, 난소암, 자궁경부암, 기관지암 및 위장관암), MUC16(CA125)(난소암), CEA(결장직장암), gp100(흑색종), MARTI(흑색종), MPG(흑색종), MS4A1(막-스페닝 4-도메인 서브페밀리 A, 소세포 폐암, NHL), 뉴클레올린, Neu 종양 유전자 산물(암종), P21(암종), 네틴-4(암종), 항-(N-글리콜릴뉴라민산, 유방암, 흑색종암)의 파라토프, PLAP-유사 고환 알칼리 포스파타제(난소암, 고환암), PSMA(전립선 종양), PSA(전립선), ROBO4, TAG 72(종양 관련 당단백질 72, AML, 위암, 결장직장암, 난소암), T 세포 막 관통 단백질(암), Tie(CD202b), 조직 인자, TNFRSF10B(종양 괴사 인자 수용체 수퍼페밀리 구성원 10B, 암종), TNFRSF13B(종양 괴사 인자 수용체 수퍼페밀리 구성원 13B, 다발성 골수종, NHL, 기타 암, RA 및 SLE), TPBG(영양막 당단백질, 신장 세포 암종), TRAIL-R1(종양 괴사 세포 사멸 유도 리간드 수용체 1, 림프종, NHL, 결장직장암, 폐암), VCAM-1(CD106, 흑색종), VEGF, VEGF-A, VEGF-2(CD309)(다양한 암). 일부 다른 종양 관련 항원 표적이 검토되었다(Gerber, et al., mAbs 2009 1 :247-253; Novellino et al., Cancer Immunol Immunother. 2005 54: 187-207, Franke, et al., Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15:459-76, Guo, et al., Adv Cancer Res. 2013; 119: 421-475, Parmiani et al. J Immunol. 2007 178: 1975-9). 이들 항원의 예로는 분화 클러스터(CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD1 1a, CD1 1b, CD1 1c, CD12w, CD14, CD15, CD16, CDw17, CD18, CD21, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD31, CD32, CD34, CD35, CD36, CD37, CD41, CD42, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49b, CD49c, CD53, CD54, CD55, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD68, CD69, CD71, CD72, CD79, CD81, CD82, CD83, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD95, CD96, CD100, CD103, CD105, CD106, CD109, CD117, CD120, CD127, CD133, CD134, CD135, CD138, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD151, CD152, CD154, CD156, CD158, CD163, CD166, CD168, CD184, CDw186, CD195, CD202(a, b), CD209, CD235a, CD271, CD303, CD304), 아넥신 A1, 뉴클레올린, 엔도글린(CD105), ROB4, 아미노-펩티다제 N, -유사-4(DLL4), VEGFR-2(CD309), CXCR4(CD184), Tie2, B7-H3, WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, HER-2/neu, 이디오타입, MAGE A3, p53 비돌연변이체, NY-ESO-1, GD2, CEA, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, gp100, p53 돌연변이체, 프로테이나제3(PR1), bcr-ab1, 티로시나제, 서바이빈(survivin), hTERT, 육종 전좌 브레이크포인트, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG(TMPRSS2 ETS 융합유전자), NA17, PAX3, ALK, 안드로겐 수용체, 사이클린 B 1, 폴리시알산, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔린, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, 탄산 탈수 효소 IX, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레구마인(legumain), Tie 2, 폐이지(Page)4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR- β , MAD-CT-2, 및 Fos-관련 항원 1이 포함된다.

[0157] 추가로, 본 발명의 바람직한 결합 도메인은 당업계에 알려진 감염된 세포와 관련된 항원 및 에피토프 표적에 특이적인 것을 포함한다. 이러한 표적으로는 다음의 관심있는 감염체로부터 유래된 것이 포함되나 이에 한정되지 않는다: HIV 바이러스(특히 HIV 외피 스파이크 및/또는 gp120 및 gp41 에피토프로부터 유래된 항원), 인간 유두종 바이러스(HPV), 미코박테리움 투베르콜로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 스트렙토코커스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*), 메티실린-저항성 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 에스케리키아

콜라아(*Escherichia coli*), 네이세리아 고노르로에아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 카슬라툼(*Histoplasma capsulatum*), -인플루엔자에 B(-*influenzae B*), 트레포네마 팔리듐(*Treponema pallidum*), 라임(Lyme) 병 스피로헤테스(spirochetes), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 미코박테리움 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 브루셀라 아보르투스(*Bruceilla abortus*), 광견병 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 단순 헤르페스 바이러스 II, 인간 혈청 파보-유사 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 바리셀라-조스터(varicella-zoster) 바이러스, B 형 간염 바이러스, C 형 간염 바이러스, 홍역 바이러스, 아데노바이러스, 인간 T-세포 백혈병 바이러스, 앰스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스, 뮤린 백혈병 바이러스, 볼거리 바이러스, 소수포 구내염 바이러스, 신드비스(sindbis) 바이러스, 립프구성 맥락수막염 바이러스, 사마귀 바이러스, 청설 바이러스, 센다이(Sendai) 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 레오바이러스, 폴리오바이러스, 원숭이 바이러스 40, 마우스 유방 종양 바이러스, 맹기열 바이러스, 풍진 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 트리파노소마 랑겔리(*Trypanosoma rangeli*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 트리파노소마 로데시엔세이(*Trypanosoma rhodesiense*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 스키스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 스키스토소마 자포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 바베시아 보비스(*Babesia bovis*), 엘메리아 테넬라(*Elmeria tenella*), 온코세르카 볼불루스(*Onchocerca volvulus*), 레이쉬마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 트리키넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*), 테일레리아 파르바(*Theileria parva*), 타에니아 하이다티게나(*Taenia hydatigena*), 타에니아 오비스(*Taenia ovis*), 타에니아 사기나타(*Taenia saginata*), 에키노코커스 그라눌로수스(*Echinococcus granulosus*), 메소세스토이데스 코르티(*Mesocestoides corti*), 미코플라스마 아르트리티디스(*Mycoplasma arthritidis*), 엠. 효리니스(*M. hyorhinis*), 엠. 오랄레(*M. orale*), 엠. 아르기니니(*M. arginini*), 아콜레플라스마 라이들라위(*Acholeplasma laidlawii*), 엠. 살리바리움(*M. salivarium*) 및 엠. 뉴모니아에(*M. pneumoniae*).

[0158] 면역 체크 포인트 저해제 및 면역 작용제 도메인

다른 구현예에서, 결합 도메인은 면역 체크 포인트 또는 신호 전달 분자 또는 그의 리간드에 특이적이고 면역 체크 포인트 억제 활성의 저해제 또는 면역 자극 활성의 작용제로서 작용한다. 이러한 면역 체크 포인트 및 신호 전달 분자 및 리간드로는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD28, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7-H5, ICOS-L, ICOS, BTLA, CD137L, CD137, HVEM, KIR, 4-1BB, OX40L, CD70, CD27, CD47, CIS, OX40, GITR, IDO, TIM3, GAL9, VISTA, CD155, TIGIT, LIGHT, LAIR-1, 시글렉스(Siglecs) 및 A2aR(Pardoll DM. 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264, Thaventhiran T, et al. 2012. J Clin Cell Immunol S12:004)가 포함된다. 추가로, 본 발명의 바람직한 항체 도메인으로는 이필리무맙 및/또는 트레렐리무맙(항-CTLA4), 니볼루맙, 펜브롤리주맙(pembrolizumab), 피딜리주맙, TSR-042, ANB011, AMP-514 및 AMP-224(리간드-Fc 융합)(항-PD1), 아테졸리주맙(atezolizumab, MPDL3280A), 아벨루맙(avelumab, MSB0010718C), 두르발루맙(durvalumab, MEDI4736), MEDI0680, 및 BMS-9365569(항-PDL1), MEDI6469(항-OX40 작용제), BMS-986016, IMP701, IMP731, IMP321(항-LAG3) 및 GITR 리간드가 포함될 수 있다.

[0160] T-세포 수용체(TCR)

T-세포는 다른 면역 세포 유형(다형핵 세포, 호산구, 호염기구, 비만 세포, B-세포, NK 세포)과 함께 면역계의 세포 성분을 구성하는 세포의 하위 군이다. 생리학적 조건 하에서, T-세포는 면역 감시 및 외래 항원 제거에서 기능한다. 그러나, 병리학적 조건 하에서, T-세포가 질병의 원인 및 전파에 주요한 역할을 한다는 강력한 증거가 있다. 이를 장애에서, 중심 또는 말초의, T-세포 면역학적 관용의 파괴는 자가 면역 질병의 원인에서의 핵심 과정이다.

TCR 복합체는 적어도 7 개의 막 관통 단백질로 구성된다. 디설파이드-연결된($\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$) 이종이량체는 단일형 항원 인식 단위를 형성하는 반면, ϵ , γ , δ , ζ , 및 η 사슬로 구성된, CD3의 불변 사슬은 T-세포 활성화 및 세포성 면역 반응의 정교화를 초래하는 신호 전달 경로에 결합하는 리간드를 연결시키는 데 역할을 한다. TCR 사슬의 유전자 다양성에도 불구하고, 2 개의 구조적 특징은 모든 알려진 서브유닛에 공통적이다. 첫째, 이들은 단일 막 관통 스패닝 도메인--짐작컨대 알파-나선형을 갖는 막 관통 단백질이다. 둘째, 모든 TCR 사슬은 예측된 막 관통 도메인 내에 하전된 아미노산을 보유하는 특이한 특징을 갖는다. 불변 사슬은 마우스와 인간 간에 보존된, 단일 음전하를 가지며, 변이 사슬은 하나(TCR- β) 또는 두 개(TCR- α)의 양전하를 갖는다. TCR- α 의 막 관통 서열은 다수의 종에서 고도로 보존되므로 계통 발생적으로 중요한 기능적 역할을 수행할 수 있다. 친수

성 아미노산 아르기닌 및 라이신을 함유하는 옥타펩타이드 서열은 종 사이에 동일하다.

[0163] T-세포 반응은 TCR에 결합하는 항원에 의해 조절된다. 일 유형의 TCR은 면역글로불린 가변(V) 및 불변(C) 영역과 유사한 α 및 β 사슬로 구성된 막 결합된 이종이량체이다. TCR α 사슬은 공유 결합으로 연결된 V- α 및 C- α 사슬을 포함하는 반면, β 사슬은 C- β 사슬에 공유 결합으로 연결된 V- β 사슬을 포함한다. V- α 및 V- β 사슬은 주요 조직적합성 복합체(MHC)(인간에서 HLA 복합체로 알려짐) 맥락에서 초항원 또는 항원에 결합할 수 있는 포켓 또는 틈을 형성한다. 문헌[Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537 (1985); Fundamental Immunology 3rd Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993)] 참고.

[0164] TCR 사슬의 세포외 도메인($\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$)은 또한 세포 표면 상 발현을 위해 이종성 막 관통 도메인에 대한 융합으로 조작될 수 있다. 이러한 TCR은 CD3, CD28, CD8, 4-1BB 및/또는 키메라 활성화 수용체(CAR) 막 관통 또는 활성화 도메인에 대한 융합을 포함할 수 있다. TCR은 또한 $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ 사슬의 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 가용성 단백질일 수 있다. 이러한 TCR은 TCR 불변 도메인을 갖거나 갖지 않는 TCR 가변 도메인 또는 이의 기능 단편을 포함할 수 있다. 가용성 TCR은 이종이량체 또는 단일-사슬 분자일 수 있다.

Fc 도메인

[0166] 본 발명의 융합 단백질 복합체는 Fc 도메인을 함유할 수 있다. 예를 들어, hIL-18/IL12/TxM은 IL-18/IL-15N72D: IL-12/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체를 포함한다. 다양한 사이토카인 및 가용성 수용체와 같은, 또 다른 단백질의 도메인과 IgG의 Fc 영역을 결합시키는 융합 단백질이 보고되어 있다(예를 들어, 문헌[Capon et al., Nature, 337:525-531, 1989; Chamow et al., Trends Biotechnol., 14:52-60, 1996]]; 미국 특허 번호 5,116,964 및 5,541,087 참고). 프로토타입 융합 단백질은 IgG Fc의 헌지 영역에서 시스테인 잔기를 통해 연결된 동종이량체 단백질로서, 중쇄 가변 및 C_H1 도메인 및 경쇄가 없는 IgG 분자와 유사한 분자를 생성한다. Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질의 이량체 특성은 다른 분자와의 고차 상호 작용(즉, 2 개 또는 이중 특이적 결합)을 제공하는 데 유리할 수 있다. 구조적 상동성으로 인해, Fc 융합 단백질은 유사한 이소타입을 갖는 인간 IgG와 유사한 생체내 약동학적 프로파일을 나타낸다. IgG 클래스의 면역글로불린은 인간 혈액에서 가장 풍부한 단백질 중 하나이고, 이들의 순환 반감기는 21 일만큼에 이를 수 있다. IL-15 또는 IL-15 융합 단백질의 순환 반감기를 연장시키고/시키거나 그의 생물학적 활성을 증가시키기 위해, 인간 중쇄 IgG 단백질의 Fc 부분에 공유 결합으로 연결된 IL-15R α 에 비-공유 결합으로 결합된 IL-15 도메인을 함유하는 융합 단백질 복합체가 본원에 기재된다.

[0167] 용어 "Fc"는 Fc 수용체라 불리는 세포 표면 수용체 및 보체 시스템의 일부 단백질과 상호 작용하는 항체의 불변 영역인 결정화 가능 영역 단편을 지칭한다. 이러한 "Fc"는 이량체 형태이다. 천연 Fc의 원래 면역글로불린 공급 원은 바람직하게는 인간 기원이며, IgG1 및 IgG2가 바람직하나, 면역글로불린 중 임의의 것일 수 있다. 천연 Fc는 공유 결합(즉, 디설파이드 결합) 및 비-공유 결합에 의해 이량체 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩타이드로 구성된다. 천연 Fc 분자의 단량체 서브유닛 간의 분자간 디설파이드 결합의 수는 클래스(예를 들어, IgG, IgA, IgE) 또는 서브클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2)에 따라 1 내지 4의 범위이다. 천연 Fc의 일 예는 IgG의 파파인 분해로부터 생성된 디설파이드-결합된 이량체이다(문헌[Ellison et al.(1982), Nucleic Acids Res. 10:4071-9] 참고). 본원에 사용된 용어 "천연 Fc"는 단량체, 이량체, 및 다량체 형태에 대한 총칭이다. 단백질 A, 단백질 G, 다양한 Fc 수용체 및 보체 단백질에 대한 결합 부위를 함유하는 Fc 도메인. 일부 구현예에서, 융합 단백질 복합체의 Fc 도메인은 Fc 수용체와 상호 작용하여 항체-의존성 세포-매개 세포 독성(ADCC) 및/또는 항체-의존성 세포성 삭세포 작용(ADCP)을 매개할 수 있다. 다른 적용에서, 융합 단백질 복합체는 ADCC 또는 ADCP를 효과적으로 매개할 수 없는 Fc 도메인(예를 들어, IgG4 Fc)을 포함한다.

[0168] 일부 구현예에서, 용어 "Fc 변이체"는 천연 Fc로부터 변형된 분자 또는 서열을 지칭하지만, 여전히 구제 수용체 FcRn에 대한 결합 부위를 포함한다. 국제 출원 WO 97/34631 및 WO 96/32478은 예시적인 Fc 변이체뿐만 아니라 구제 수용체와의 상호 작용을 기술하고, 이는 본원에 참조로서 포함된다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비-인간 천연 Fc로부터 인간화된 분자 또는 서열을 포함한다. 또한, 천연 Fc는 본 발명의 융합 분자에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문에 제거될 수 있는 부위를 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 용어 "Fc 변이체"는 (1) 디설파이드 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 부적합성 (3) 선택된 숙주 세포에서 발현 시 N-말단 불균일성, (4) 글리코실화, (5) 보체와의 상호 작용, (6) 구제 수용체 외에 Fc 수용체에 결합하는 것, (7) 항체-의존성 세포성 세포 독성(ADCC) 또는 (8) 항체-의존성 세포성 삭세포 작용(ADCP)에 영향을 주거나 이들과 관여하는 하나 이상의 천연 Fc 부위 또는 잔기를 변경시키는 분자 또는 서열을 포함한다. 이러한 변경은 이들 Fc 특성 중 임의의 하나 이상을 증가 또는 감소시킬 수 있다. Fc 변이체는 이후에 추가로 상세하게

기재된다.

[0169] 용어 "Fc 도메인"은 상기 정의된 천연 Fc 및 Fc 변이체 분자 및 서열을 포함한다. Fc 변이체 및 천연 Fc에서와 같이, 용어 "Fc 도메인"은 전체 항체로부터 분해되거나 재조합 유전자 발현에 의해 또는 다른 수단에 의해 생산된 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함한다.

링커

[0171] 일부 경우에, 본 발명의 융합 단백질 복합체는 또한 IL-15 또는 IL-15R α 도메인과 IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인 또는 IL-12 서브유닛 사이에 있는 가요성 링커 서열을 포함한다. 링커 서열은 IL-15 또는 IL-15R α 도메인에 대한 폴리펩타이드의 효과적인 위치 설정을 가능하게 하여 두 도메인 모두의 기능적 활성을 가능하게 해야 한다. 대안적으로, 링커는 기능적 IL-12 결합 도메인의 형성을 가능하게 해야 한다.

[0172] 특정 경우에, 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지며 여기서 제1 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 링커 서열에 의해 IL-15(또는 이의 기능적 단편)에 공유 결합으로 연결된다. 다른 양태에서, 본원에 기재된 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지며 여기서 제2 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 링커 서열에 의해 IL-15R α 폴리펩타이드(또는 이의 기능적 단편)에 공유 결합으로 연결된다.

[0173] 링커 서열은 바람직하게는 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되어 제시하는 항원의 인식을 위한 TCR 분자의 결합 흄 또는 항원의 인식을 위한 항체 분자의 결합 도메인을 효과적으로 위치시킬 수 있는 펩타이드를 생성한다. 본원에 사용된 문구 "IL-15 또는 IL-15R α 도메인에 대한 생물학적 활성 폴리펩타이드의 효과적인 위치 설정", 또는 다른 유사한 문구는 IL-15 또는 IL-15R α 도메인에 연결된 생물학적 활성 폴리펩타이드가 IL-15 또는 IL-15R α 도메인이 서로 상호 작용하여 단백질 복합체를 형성할 수 있도록 위치 설정된다는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 예를 들어, IL-15 또는 IL-15R α 도메인은 면역 세포와의 상호 작용이 면역 반응을 개시 또는 저해하거나, 세포 발달을 저해 또는 자극 가능하도록 효과적으로 위치 설정된다.

[0174] 본 발명의 융합 단백질 복합체는 바람직하게는 IL-15 또는 IL-15R α 도메인과 면역글로불린 Fc 도메인 사이에 있는 가요성 링커 서열을 또한 포함한다. 링커 서열은 각 도메인의 기능적 활성을 가능하도록 하기 위해 Fc 도메인, 생물학적 활성 폴리펩타이드 및 IL-15 또는 IL-15R α 도메인의 효과적인 위치 설정을 가능하게 해야 한다. 예를 들어, Fc 도메인은 적절한 융합 단백질 복합체 형성 및/또는 면역 세포 상의 Fc 수용체 또는 보체 시스템의 단백질과의 상호 작용이 옵소닌화, 세포 용해, 비만 세포, 호염기구와 호산구의 탈파립화, 및 다른 Fc 수용체-의존성 과정; 보체 경로의 활성화; 및 융합 단백질 복합체의 향상된 생체내 반감기를 포함하는 Fc-매개 효과를 자극 가능하도록 효과적으로 위치 설정된다.

[0175] 링커 서열은 또한 원하는 기능적 활성을 갖는 단일-사슬 분자를 생성하기 위해 생물학적 활성 폴리펩타이드 중 둘 이상의 폴리펩타이드를 연결하는 데 사용될 수 있다.

[0176] 바람직하게는, 링커 서열은 약 7 내지 20 개 아미노산, 더욱 바람직하게는 약 10 내지 20 개 아미노산을 포함한다. 링커 서열은 바람직하게는 단일의 원치 않는 형태로 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이펙터 분자를 유지하지 않도록 가요성이다. 링커 서열은, 예를 들어 인식 부위를 융합된 분자로부터 이격시키기 위해 사용될 수 있다. 구체적으로, 펩타이드 링커 서열은 생물학적 활성 폴리펩타이드와 이펙터 분자 사이에 위치하여, 예를 들어 이를 화학적으로 가교-결합시키고 분자 가요성을 제공할 수 있다. 링커는 가요성을 제공하기 위해 바람직하게는 글리신, 알라닌 및 세린과 같은 작은 측쇄를 갖는 아미노산을 주로 포함한다. 바람직하게는, 링커 서열의 약 80 또는 90% 이상은 글리신, 알라닌 또는 세린 잔기, 특히 글리신 및 세린 잔기를 포함한다.

[0177] 항체 가변 영역을 함께 결합시키는 데 성공적으로 사용되었던 다수의 가요성 링커 설계 중 임의의 것을 포함하는 상이한 링커 서열이 사용될 수 있다(문헌[Whitlow, M. et al., (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105] 참고).

입양 세포 요법

[0179] 입양 세포 요법(ACT)(동종 이계 및 자가 조혈 줄기 세포 이식(HSCT) 및 재조합 세포(즉, CAR T) 요법 포함)은 많은 악성 장애에 대한 선택 치료이다(HSCT 및 입양 세포 요법 접근에 대한 검토를 위해, 문헌[Rager & Porter, Ther Adv Hematol (2011) 2(6): 409-428; Roddie & Peggs, Expert Opin. Biol. Ther. (2011) 11(4):473-487; Wang et al. Int. J. Cancer: (2015)136, 1751-1768; and Chang, Y.J. and X.J. Huang, Blood Rev, 2013. 27(1): 55-62] 참고). 이러한 입양 세포 요법으로는 동종 이계 및 자가 조혈 줄기 세포 이식, 공여자 백혈구(또는 림프구) 주입(DLI), 종양 침윤 림프구의 입양 전달, 또는 T 세포 또는 NK 세포(재조합 세포, 즉 CAR T, CAR

NK, 유전자-편집 T 세포 또는 NK 세포 포함, 문헌[Hu et al. *Acta Pharmacologica Sinica*(2018) 39: 167-176, Irving et al. *Front Immunol.*(2017) 8: 267.] 참고]의 입양 전달이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 방사선 및 화학 요법 후 공여자-유래 세포가 조혈을 재구성할 필요성 이상으로, 전달된 세포로부터의 면역학적 재구성은 잔류 종양 세포의 제거에 중요하다. 악성 종양에 대한 치료적 선택으로서의 ACT의 효능은 공여자 세포의 기원, 조성 및 표현형(림프구 서브세트, 활성화 상태), 기저 질병, 이식-전 조건화 요법 및 이식-후 면역지지(즉, IL-2 요법) 및 이식 편 내의 공여자 세포에 의해 매개되는 이식 편-대-종양(GVT) 효과를 포함하는 다수의 인자에 의해 영향을 받는다. 추가로, 이들 인자는 전형적으로 숙주 내의 공여자 세포의 조건화 요법 및/또는 과도한 면역 활성(예를 들어, 이식 편-대-숙주 질병, 사이토카인 방출 증후군 등)으로부터 유발되는 이식-관련 사망률과 견줘야 한다.

[0180] 입양 NK 세포 요법을 이용하는 접근은 상당한 관심을 끌고 있다. 자가 HSCT를 수령하는 환자에서, 혈액 NK 세포 수는 이식 후 매우 일찍 회복되며 NK 세포의 수준은 긍정적 결과와 상관 관계가 있다(Rueff et al., 2014, *Biol. Blood Marrow Transplant.* 20, 896-899). 자가 NK 세포 전달을 이용하는 치료 전략은 다수의 인자로 인해 제한적인 성공을 거두었지만, 생체외-활성화된 동종 이계(또는 훌배수-동종) NK 세포의 입양 전달은 암에 대한 유망한 면역 치료 전략으로 떠오르고 있다(Guillerey et al. 2016. *Nature Immunol.* 17: 1025-1036). 이들 세포의 활성은 자가 NK 세포와 비교하여 자기-MHC 분자에 의해 억제될 가능성이 더 적다. 다수의 연구는 종양 세포에 대한 동종이식편반응을 활용하기 위한 훌배수동종 NK 세포를 이용한 입양 요법이 안전하고 AML 환자에서 유의한 임상 활성을 매개할 수 있음을 보여줬다. 이들 발견을 추가로 취하여, 최근의 연구는 NK 세포 또는 NK 전구체(즉, 줄기 세포)에 대한 생체외 활성화/팽창 방법 및 이식-전 조건화 및 이식-후 면역지지 전략을 최적화하는 것; NK 세포주 또는 재조합 종양-표적화 NK 세포의 사용; 치료제 Ab, 면역 조절제(레날리도마이드), 및 항-KIR 및 체크 포인트 Ab와 같은 다른 제제와 조합된 요법의 평가에 초점을 맞추고 있다. 각각의 경우에, 이들 전략은 본 발명의 융합 단백질 복합체에 의해 보완될 수 있으며, 이는 NK 세포 증식 및 활성화를 증대시키는 능력을 갖는다. 본원에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질 복합체와 NK 세포의 생체외 인큐베이션은 상승된 활성화 마커, 종양 세포에 대한 증가된 세포 독성 및 향상된 IFN- γ 생산을 나타내는 CIML NK 세포의 유도를 초래한다. 추가로, 본 발명의 융합 단백질 복합체는 인간 NK 세포주를 활성화시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질 복합체의 직접 투여 또는 본 발명의 융합 단백질 복합체에 의해 활성화된 면역 세포의 투여에 의해 면역 반응을 증대시키고 신생물 및 감염 질병을 치료하는 방법이 제공된다.

약학 치료제

[0181] [0182] 본 발명은 치료제로서의 사용을 위한 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 복합체는 전신으로, 예를 들어, 생리 식염수와 같은 약학적으로-허용 가능한 완충제에 제형화되어 투여된다. 바람직한 투여 경로로는, 예를 들어 환자에서 조성물의 연속적, 지속적 또는 효과적인 수준을 제공하는 방광 내로의 점적주입, 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 종양내 또는 피내 주사가 포함된다. 인간 환자 또는 다른 동물의 치료는 생리학적으로-허용 가능한 담체 중 본원에서 확인된 치료적 유효량의 치료제를 사용하여 수행된다. 적합한 담체 및 이들의 제형은, 예를 들어 문헌[E.W. Martin의 *Remington's Pharmaceutical Sciences*]에 기재되어 있다. 투여되는 치료제의 양은 투여 방식, 환자의 연령 및 체중, 및 신생물의 임상 증상에 따라 달라진다. 일반적으로, 특정 경우에 화합물의 특이성 증가로 인해 더 적은 양이 필요할 것이나, 양은 신생물 또는 감염성 질병과 관련된 다른 질병의 치료에 사용되는 다른 제제에 대해 사용되는 양의 범위 내에 있을 것이다. 화합물은 대상체의 면역 반응을 향상시키는 투여량, 또는 당업자에게 알려진 방법에 의해 결정되는 신생물 또는, 감염된 세포의 증식, 생존, 또는 침습성을 감소시키는 투여량으로 투여된다.

약학 조성물의 제형

[0183] [0184] 신생물 또는 감염성 질병의 치료를 위한 본 발명의 융합 단백질 복합체의 투여는, 다른 성분과 조합하여, 상기 신생물 또는 감염성 질병을 개선, 감소, 또는 안정화시키는 데 효과적인 치료제의 농도를 생성하는 임의의 적합한 수단에 의한다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 임의의 적합한 담체 물질 중 임의의 적절한 양으로 함유될 수 있으며, 일반적으로 조성물의 총 중량의 1 내지 95 중량%의 양으로 존재한다. 조성물은 비경구(예를 들어, 피하, 정맥내, 근육내, 소포내(intravesicular), 종양내 또는 복강내) 투여 경로에 적합한 투약 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 약학 조성물은 통상적인 약학적 관습에 따라 제형화된다(예를 들어, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*(20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York] 참고).

[0185]

당업자는 동물 모델과 비교하여 인간의 투여량을 변경하는 것이 당업계에서 일상적인 것으로 인식하기 때문에, 인간 투여량은 초기에 마우스 또는 비-인간 영장류에 사용된 화합물의 양으로부터 외삽함으로써 결정된다. 예를 들어, 투여량은 약 1 μg 화합물/kg 체중 내지 약 5000 mg 화합물/kg 체중; 또는 약 5 mg/kg 체중 내지 약 4,000 mg/kg 체중 또는 약 10 mg/kg 체중 내지 약 3,000 mg/kg 체중; 또는 약 50 mg/kg 체중 내지 약 2000 mg/kg 체중; 또는 약 100 mg/kg 체중 내지 약 1000 mg/kg 체중; 또는 약 150 mg/kg 체중 내지 약 500 mg/kg 체중으로 다양할 수 있다. 예를 들어, 투여량은 약 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,000, 1,050, 1,100, 1,150, 1,200, 1,250, 1,300, 1,350, 1,400, 1,450, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500, 또는 5,000 mg/kg 체중이다. 대안적으로, 투여량은 약 5 mg 화합물/kg 체중 내지 약 20 mg 화합물/kg 체중의 범위에 있다. 또 다른 실시예에서, 투여량은 약 8, 10, 12, 14, 16 또는 18 mg/kg 체중이다. 바람직하게는, 융합 단백질 복합체는 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg(예를 들어, 0.5, 1, 3, 5, 10 mg/kg)으로 투여된다. 물론, 이 투여량은 초기 임상 시험의 결과 및 구체적인 환자의 요구에 따라, 이러한 치료 프로토콜에서 일상적으로 수행되는 바와 같이 상향 또는 하향 조정될 수 있다.

[0186]

약학 조성물은 적절한 부형제와 함께, 투여시, 제어된 방식으로 치료제를 방출하는 약학 조성물로 제형화된다. 예로는 단일 또는 다수 단위 정제 또는 캡슐 조성물, 오일 용액, 혼탁액, 에멀젼, 마이크로캡슐, 마이크로스피어, 분자 복합체, 나노입자, 패치, 및 리포솜이 포함된다. 바람직하게는, 융합 단백질 복합체는 비경구 투여에 적합한 부형제 중에 제형화된다.

[0187]

비경구 조성물

[0188]

본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 통상적인, 비-독성의 약학적으로 허용되는 담체 및 보조제를 함유하는 투약 형태나 제형으로, 또는 적합한 전달 장치 또는 이식물을 통해 주사되거나, 주입되거나, 이식됨으로써(피하, 정맥내, 근육내, 종양내, 소포내, 복강내) 비경구 투여된다. 이러한 조성물의 제형 및 제조는 약학적 제형의 당업자에게 잘 알려져 있다. 제형은 상기 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy]에서 찾을 수 있다.

[0189]

비경구 사용을 위한 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 조성물은 단위 투약 형태(예를 들어, 단일-투여량 앰풀)로 제공된다. 대안적으로, 조성물은 몇몇의 투여량을 함유하고 적합한 보존제가 첨가될 수 있는 바이알로 제공된다(하기 참고). 조성물은 용액, 혼탁액, 에멀젼, 주입 장치, 또는 이식용 전달 장치의 형태이거나, 사용 전에 물 또는 또 다른 적합한 비히클을 이용하여 재구성되는 건조 분말로서 제공된다. 신생물 또는 감염성 질병을 감소시키거나 개선시키는 활성제 외에, 조성물은 비경구적으로 허용 가능한 적합한 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 활성 치료제(들)는 제어된 방출을 위해 마이크로스피어, 마이크로캡슐, 나노입자, 리포솜 내에 포함될 수 있다. 또한, 조성물은 혼탁제, 가용화제, 안정화제, pH-조절제, 장성(tonicity) 조절제, 및/또는 분산제를 포함할 수 있다.

[0190]

상기 나타난 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 멸균 주사에 적합한 형태일 수 있다. 이러한 조성물을 제조하기 위해, 적합한 활성 치료제(들)가 비경구적으로 허용 가능한 액체 비히클에 용해되거나 혼탁된다. 사용될 수 있는 허용 가능한 비히클 및 용매 중에는 물, 적절한 양의 염산, 소듐 하이드록사이드 또는 적합한 완충액을 첨가하여 적합한 pH로 조정된 물, 1,3-부탄디올, 링거(Ringer's) 용액, 및 등장 소듐 클로라이드 용액 및 텍스트로스 용액이 있다. 수성 제형은 또한 하나 이상의 보존제(예를 들어, 메틸, 에틸 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트)를 함유할 수 있다. 화합물 중 하나가 물에 오직 조금만 또는 약간 가용성인 경우, 용해 증강제 또는 가용화제가 첨가될 수 있거나, 용매가 10 내지 60% w/w의 프로필렌 글리콜을 포함할 수 있다.

[0191]

본 발명은 본원의 제조법의 화합물을 포함하는 약학 조성물의 치료적 유효량을 대상체(예를 들어, 인간과 같은 포유동물)에 투여하는 것을 포함하는 신생물 또는 감염성 질병 또는 이의 증상을 치료하는 방법을 제공한다. 따라서, 일 구현예는 신생물 또는 감염성 질병 또는 이의 증상을 앓고 있거나 이에 걸리기 쉬운 대상체를 치료하는 방법이다. 방법은 질병 또는 장애가 치료되는 조건 하에서, 질병 또는 장애 또는 이의 증상을 치료하기에 충분한 양의 본원의 화합물의 치료량을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0192]

본원의 방법은 대상체(이러한 치료가 필요한 것으로 식별된 대상체를 포함)에게 이러한 효과를 생산하는 본원에 기재된 화합물, 또는 본원에 기재된 조성물을 유효량 투여하는 것을 포함한다. 이러한 치료가 필요한 대상체를 식별하는 것은 대상체 또는 건강 관리 전문가의 판단에 있을 수 있고 주관적(예를 들어, 의견) 또는 객관적(예

를 들어, 테스트 또는 진단 방법으로 측정 가능한)일 수 있다.

[0193] 본 발명의 치료 방법(예방적 치료 포함)은 일반적으로 본원의 화합물, 예를 들어 본원의 화학식의 화합물의 치료적 유효량을, 포유동물, 특히 인간을 포함하는 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 동물, 인간)에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 치료는 신생물, 감염성 질병, 장애, 또는 이의 증상을 앓고 있거나, 갖고 있거나, 이에 걸리기 쉽거나, 이에 대한 위험이 있는 대상체, 특히 인간에게 적합하게 투여될 것이다. "위험이 있는" 대상체의 결정은 진단 테스트 또는 대상체 또는 건강 관리 제공자의 의견(예를 들어, 유전자 테스트, 효소 또는 단백질 마커, 마커(본원에 정의된), 가족력 등)에 의한 임의의 객관적 또는 주관적 결정에 의해 이루어질 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 면역 반응의 증가가 요구되는 임의의 다른 장애의 치료에 사용될 수 있다.

[0194] 본 발명은 또한 치료 과정을 모니터링하는 방법을 제공한다. 방법은 신생물 관련된 장애 또는 이의 증상을 앓고 있거나 이에 걸리기 쉬운 대상체에서 진단 마커(마커)의 수준(예를 들어, 본원의 화합물에 의해 조절되는 본원에 기술된 임의의 표적, 단백질 또는 이의 지표, 등) 또는 진단 측정(예를 들어, 스크리닝, 분석)을 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 대상체는 질병 또는 이의 증상을 치료하기에 충분한 치료량의 본원의 화합물이 투여된다. 방법에서 결정된 마커의 수준은 건강한 정상 대조군 또는 다른 병에 걸린 환자에서의 마커의 알려진 수준과 비교되어 대상체의 질병 상태를 확립할 수 있다. 일부 경우에, 대상체에서의 마커의 제2 수준은 제1 수준의 결정보다 늦은 시점에 결정되고, 2 개의 수준은 질병의 경과 또는 요법의 효능을 모니터링하기 위해 비교된다. 특정 양태에서, 대상체에서의 마커의 치료-전 수준은 본 발명에 따라 치료를 시작하기 전에 결정되며; 이어서, 마커의 이 치료-전 수준은 치료 효능을 결정하기 위해, 치료 개시 후 대상체에서의 마커의 수준과 비교될 수 있다.

조합 요법

[0195] 선택적으로, 본 발명의 융합 단백질 복합체 또는 본 발명의 융합 단백질 복합체로 처리된 면역 세포는 임의의 다른 표준 요법과 조합하여 투여되고; 이러한 방법은 당업자에게 알려져 있으며 문헌[E.W. Martin의 Remington's Pharmaceutical Sciences]에 기재되어 있다. 원하는 경우, 본 발명의 융합 단백질 복합체 또는 본 발명의 융합 단백질 복합체로 처리된 면역 세포는 면역 요법, 임양 세포 요법, 백신, 치료제 및 체크 포인트 저해제 항체, 표적 요법, 수술, 방사선 요법, 또는 화학 요법을 포함하나 이에 한정되지 않는, 임의의 통상적인 항-신생물 요법과 조합하여 투여된다.

키트 또는 약학 시스템

[0196] 본 발명의 융합 단백질 복합체 또는 본 발명의 융합 단백질 복합체로 처리된 면역 세포를 포함하는 약학 조성물은 신생물 또는 감염성 질병을 개선하는 데 사용하기 위한 키트 또는 약학 시스템으로 조립될 수 있다. 본 발명의 이 양태에 따른 키트 또는 약학 시스템은, 바이알, 튜브, 앰풀, 병 등과 같은 하나 이상의 용기 수단을 그 안의 좁은 공간에 가둔, 상자, 카톤, 튜브와 같은 캐리어 수단을 포함한다. 본 발명의 키트 또는 약학 시스템은 또한 본 발명의 융합 단백질 복합체를 사용하기 위한 관련 지시서를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 키트는 본 발명의 융합 단백질 복합체를 사용하여 면역 세포의 생체외 치료를 가능하게 하고/하거나, 환자에게 이러한 세포를 투여하는 것을 가능하게 하는 백(bag), 병, 튜브와 같은 적절한 용기를 포함한다. 키트는 또한 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 의료 장치를 포함할 수 있다.

재조합 단백질 발현

[0200] 일반적으로, 본 발명의 융합 단백질 복합체(예를 들어, TxM 복합체의 성분)의 제조는 본원에 개시된 절차 및 인식된 재조합 DNA 기술에 의해 달성될 수 있다.

[0201] 일반적으로, 재조합 폴리펩타이드는 적합한 발현 비히클 내의 폴리펩타이드-인코딩 핵산 분자 또는 이의 단편의 전부 또는 부분을 이용하여 적합한 숙주 세포를 형질 전환함으로써 생산된다. 분자 생물학 분야의 당업자는 매우 다양한 발현 시스템 중 임의의 것이 재조합 단백질을 제공하는 데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 사용된 정확한 숙주 세포는 본 발명에 중요하지 않다. 재조합 폴리펩타이드는 사실상 임의의 진핵 생물 숙주(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 예를 들어 Sf21 세포, 또는 포유류 세포, 예를 들어, NIH 3T3, HeLa, 또는 바람직하게는 COS 세포)에서 생산될 수 있다. 이러한 세포는 광범위한 공급원으로부터 이용 가능하다(예를 들어, 기관[American Type Culture Collection, Rockland, Md.]; 또한, 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, New York: John Wiley and Sons, 1997] 참고). 형질 감염 방법 및 발현 비히클의 선택은 선택된 숙주 시스템에 의해 좌우될 것이다. 형질 전환

방법은 예를 들어 상기 문헌[Ausubel et al.]에 기재되어 있고; 발현 비히클은 예를 들어 문헌[Cloning Vectors: A Laboratory Manual(P.H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987)]에 제공된 것으로부터 선택될 수 있다.

[0202]

재조합 폴리펩타이드의 생산을 위한 다양한 발현 시스템이 존재한다. 이러한 폴리펩타이드를 생성하는 데 유용한 발현 백터로는, 제한 없이, 염색체, 에피솜, 및 바이러스-유래 백터, 예를 들어 박테리아 플라스미드로부터, 박테리오파지로부터, 트랜스포존으로부터, 효모 에피솜으로부터, 삽입 요소로부터, 효모 염색체 요소로부터, 바콜로바이러스, 파포바 바이러스, 예를 들어 SV40, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 가금 폭스 바이러스, 가성광견병 바이러스 및 레트로바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 백터, 및 이들의 조합으로부터 유래된 백터가 포함된다.

[0203]

일단 재조합 폴리펩타이드가 발현되면, 예를 들어 친화성 크로마토그래피를 사용하여 단리된다. 일 실시예에서, 폴리펩타이드에 대해 생성된 항체(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 생산됨)는 칼럼에 부착되어 재조합 폴리펩타이드를 단리하는 데 사용될 수 있다. 친화성 크로마토그래피 이전의 폴리펩타이드-보유 세포의 용해 및 분획은 표준 방법에 의해 수행될 수 있다(예를 들어, 상기 문헌(Ausubel et al.) 참고). 일단 단리되면, 재조합 단백질은, 원하는 경우, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다(예를 들어, 문헌[Fisher, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980 참고]).

[0204]

본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이팩터 분자는 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 효소와 같은 다른 생물활성 단백질과 같은 인자를 포함할 수 있다. 또한, 생물학적 활성 폴리펩타이드는 비-단백질 독소, 세포 독성 제제, 화학 요법 제제, 검출 가능한 표지, 방사능 물질 등과 같은 다른 화합물에 대한 접합체를 포함할 수 있다.

[0205]

본 발명의 사이토카인은 다른 세포에 영향을 미치고 세포 면역의 다수의 다중 효과 중 임의의 것에 역할을 하는 세포에 의해 생산된 임의의 인자로 정의된다. 사이토카인의 예로는 IL-2 패밀리, 인터페론(IFN), IL-10, IL-12, IL-18, IL-1, IL-17, TGF 및 TNF 사이토카인 패밀리, 및 IL-1 내지 IL-35, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , TNF- α , 및 TNF- β 가 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0206]

본 발명의 양태에서, 제1 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 도메인 또는 이의 기능적 단편에 공유 결합으로 연결된 제1 생물학적 활성 폴리펩타이드를 포함한다. IL-15는 T-세포 활성화 및 증식에 영향을 미치는 사이토카인이다. 근본적인 차이는 잘 특성 규명되어 있으나(Waldmann, TA, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601), 면역 세포 활성화 및 증식에 영향을 미치는 IL-15 활성은 어느 점에서는 IL-2와 유사하다.

[0207]

본 발명의 또 다른 양태에서, 제1 단백질은 IL-15 변이체(본원에서 IL-15 돌연변이체라고도 지칭됨)인 인터루킨-15(IL-15) 도메인을 포함한다. IL-15 변이체는 바람직하게는 천연(또는 야생형) IL-15 단백질과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. IL-15 변이체는 바람직하게는 IL-15R α 폴리펩타이드에 결합하고 IL-15 작용제 또는 길항제로서 기능한다. 바람직하게는, 작용제 활성을 갖는 IL-15 변이체는 수퍼 작용제 활성을 갖는다. IL-15 변이체는 IL-15R α 와의 회합과는 독립적인 IL-15 작용제 또는 길항제로서 기능할 수 있다. IL-15 작용제는 야생형 IL-15와 비교하여 유사하거나 증가된 생물학적 활성으로 예시된다. IL-15 길항제는 야생형 IL-15와 비교하여 감소된 생물학적 활성 또는 IL-15-매개 반응을 저해하는 능력에 의해 예시된다. 일부 실시예에서, IL-15 변이체는 IL-15R β - γ C 수용체에 증가되거나 감소된 활성으로 결합한다. 일부 경우에, IL-15 변이체의 서열은 적어도 하나의 아미노산 변화, 예를 들어 천연 IL-15 서열과 비교하여 치환 또는 결실을 갖고, 이러한 변화는 IL-15 작용제 또는 길항제 활성을 초래한다. 바람직하게는, 아미노산 치환/결실은 IL-15R β 및/또는 γ C와 상호 작용하는 IL-15의 도메인에 존재한다. 더욱 바람직하게는, 아미노산 치환/결실은 IL-15R α 폴리펩타이드에 대한 결합 또는 IL-15 변이체를 생성하는 능력에 영향을 미치지 않는다. IL-15 변이체를 생성하기 위한 적합한 아미노산 치환/결실은 추정 또는 알려진 IL-15 구조, 알려진 구조를 갖는 IL-2와 같은 상동성 분자와 IL-15의 비교, 본원에서 제공된, 논리적 또는 무작위 돌연변이유발 및 기능적 분석을 통해, 또는 다른 실험적 방법에 기반하여 식별될 수 있다. 추가로, 적합한 아미노산 치환은 추가의 아미노산의 보존적 또는 비-보존적 변화 및 삽입일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 IL-15 변이체는 성숙 인간 IL-15 서열의 위치 6, 8, 10, 61, 65, 72, 92, 101, 104, 105, 108, 109, 111, 또는 112에서 하나 이상의 아미노산 치환/결실을 함유하고; 특히, D8N("D8"은 천연 성숙 인간 IL-15 서열에서 아미노산 및 잔기 위치를 지칭하고 "N"은 IL-15 변이체에서의 그 위치에서 치환된 아미노산 잔기를 지칭한다), I6S, D8A, D61A, N65A, N72R, V104P 또는 Q108A 치환은 길항제 활성을 갖는 IL-15 변이체를 초래하고 N72D 치환은 작용제 활성을 갖는 IL-15 변이체를 초래한다.

- [0208] 사이토카인과 유사한, 케모카인은 다른 세포에 노출될 때 세포 면역의 다수의 다중 효과 중 임의의 것에 역할을 하는 임의의 화학적 인자 또는 분자로 정의된다. 적합한 케모카인으로는 CXC, CC, C, 및 CX₃C 케모카인 패밀리 및 CCL-1 내지 CCL-28, CXC-1 내지 CXC-17, XCL-1, XCL-2, CX3CL1, MIP-1b, IL-8, MCP-1, 및 란테스(Rantes)가 포함될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0209] 성장 인자는 구체적인 세포에 노출될 때 영향을 받는 세포의 종식 및/또는 분화를 유도하는 임의의 분자를 포함한다. 성장 인자는 단백질 및 화학 분자를 포함하며, 이를 중 일부는 GM-CSF, G-CSF, 인간 성장 인자 및 줄기 세포 성장 인자를 포함한다. 추가의 성장 인자가 또한 본원에 기재된 용도에 적합할 수 있다.
- [0210] 독소 또는 세포 독성 제제는 세포에 노출될 때 치명적인 효과 또는 성장에 저해적 효과를 갖는 임의의 물질을 포함한다. 더욱 구체적으로, 이펙터 분자는 예를 들어 디프테리아 독소(DT), 시가 독소, 아브린, 콜레라 독소, 리신(ricin), 사포린, 슈도모나스 외독소(PE), 미국자리공 항바이러스 단백질, 또는 젤로닌과 같은, 예를 들어, 식물 또는 박테리아 기원의 세포 독소일 수 있다. 이러한 독소의 생물학적 활성 단편은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 DT A 사슬 및 라이신 A 사슬을 포함한다. 추가로, 독소는, 예를 들어 포스포리파제 효소(예를 들어, 포스포리파제 C)와 같이 세포 표면에서 활성인 제제일 수 있다.
- [0211] 추가로, 이펙터 분자는, 예를 들어 빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 블레오마이신, 또는 시스플라틴과 같은 화학 요법 약물일 수 있다.
- [0212] 추가로, 이펙터 분자는 진단 또는 영상 연구에 적합한 검출 가능하게-표지된 분자일 수 있다. 이러한 표지로는 바이오틴 또는 스트렙타비딘/아비딘, 검출 가능한 나노입자 또는 결정, 효소 또는 이의 촉매적 활성 단편, 녹색 형광 단백질, FITC, 피코에리트린, 사이콤(cychrome), 텍사스 레드 또는 양자점과 같은 형광 표지; 방사성 핵종, 예를 들어 요오드-131, 이트륨-90, 레늄-188 또는 비스무트-212; 인광 또는 화학 발광 분자 또는 PET, 초음파 또는 MRI에 의해 검출 가능한 표지, 예를 들어 Gd- 또는 상자성 금속 이온-기반 조영제가 포함된다. 예를 들어, 이펙터 또는 태그를 포함하는 단백질의 제조 및 사용에 관한 개시내용에 대해 문헌[Moskaug, et al. *J. Biol. Chem.* 264, 15709 (1989); Pastan, I. et al. *Cell* 47, 641, 1986; Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, *Pharmac. Ther.*, 25, 355 (1982); 공개된 PCT 출원 번호 WO 94/29350; 공개된 PCT 출원 번호 WO 94/04689; 공개된 PCT 출원 번호 WO2005046449 및 미국 특허 번호 5,620,939] 참고.
- [0213] 본 발명의 IL-15 및 IL-15R α 폴리펩타이드는 아미노산 서열에서 천연적으로 발생하는 IL-15 및 IL-15R α 분자, 예를 들어 인간, 마우스 또는 다른 설치류, 또는 다른 포유동물의 IL-15 및 IL-15R α 분자에 적합하게 상응한다. 이를 폴리펩타이드 및 인코딩 핵산의 서열은, 인간 인터루킨 15(IL15) mRNA-젠햄크:U14407.1(본원에 참조로서 포함됨), 무스 무스쿨루스(Mus musculus) 인터루킨 15(IL15) mRNA-젠햄크:U14332.1(본원에 참조로서 포함됨), 인간 인터루킨-15 수용체 알파 사슬 전구체(IL15RA) mRNA-젠햄크:U31628.1(본원에 참조로서 포함됨), 무스 무스쿨루스 인터루킨 15 수용체, 알파 사슬-젠햄크:BC095982.1(본원에 참조로서 포함됨)을 포함하여, 문헌에 알려져 있다.
- [0214] 일부 설정에서, 예를 들어 sc-항체의 결합자를 증가시키기 위해 본 발명의 단백질 융합 또는 접합 복합체를 다가로 만드는 것이 유용할 수 있다. 특히, 융합 단백질 복합체의 IL-15와 IL-15R α 도메인 사이의 상호 작용은 다가 복합체를 생성하는 수단을 제공한다. 또한, 다가 융합 단백질은, 예를 들어 표준 바이오틴-스트렙타비딘 표지 기술을 사용함으로써, 또는 라텍스 비드와 같은 적합한 고체 지지체와의 접합에 의해, 1 개 내지 4 개 단백질(동일 또는 상이)을 공유 결합으로 또는 비-공유 결합으로 서로 연결하여 제조될 수 있다. 화학적으로 가교된 단백질(예를 들어, 텐드리머에 가교된) 또한 적합한 다가 종이다. 예를 들어, 단백질은 바이오티닐화 BirA 태그와 같이 변형될 수 있는 태그 서열을 인코딩하는 서열 또는 Cys 또는 His와 같이 화학적 반응성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기를 포함함으로써 변형될 수 있다. 이러한 아미노산 태그 또는 화학적 반응성 아미노산은 융합 단백질에서의 다양한 위치, 바람직하게는 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이펙터 분자의 활성 부위에 대해 원위에 위치될 수 있다. 예를 들어, 가용성 융합 단백질의 C-말단은 이러한 반응성 아미노산(들)을 포함하는 태그 또는 다른 융합된 단백질에 공유 결합으로 연결될 수 있다. 2 개 이상의 융합 단백질을 적합한 텐드리머 또는 다른 나노입자에 화학적으로 연결하여 다가 분자를 제공하기 위해 적합한 측쇄가 포함될 수 있다. 텐드리머는 표면의 다수의 상이한 작용기 중 임의의 하나를 가질 수 있는 합성 화학 중합체이다(D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101(1993)). 본 발명에 따라 사용하기 위한 예시적인 텐드리머로는 예를 들어 시스테인 잔기를 연결할 수 있는, E9 스타버스트(starburst) 폴리아민 텐드리머 및 E9 컴부스트(combust) 폴리아민 텐드리머가 포함된다. 예시적인 나노입자로는 리포솜, 코어-쉘 입자 또는 PLGA-기반 입자가 포함된다.

[0215]

또 다른 양태에서, 융합 단백질 복합체의 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두는 면역글로불린 도메인을 포함한다. 대안적으로, 단백질 결합 도메인-IL-15 융합 단백질은 면역글로불린 도메인에 추가로 연결될 수 있다. 바람직한 면역글로불린 도메인은 다른 면역글로불린 도메인과의 상호 작용으로 상기 제공된 다중 사슬 단백질을 형성 가능하게 하는 영역을 포함한다. 예를 들어, IgG1 C_H2-C_H3과 같은, 면역글로불린 중쇄 영역은 Fc 영역을 생성하기 위해 안정적으로 상호 작용할 수 있다. Fc 도메인을 포함하는 바람직한 면역글로불린 도메인은 또한 Fc 수용체 또는 보체 단백질 결합 활성을 포함하는 이펙터 기능, 및/또는 글리코실화 부위를 갖는 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 융합 단백질 복합체의 면역글로불린 도메인은 Fc 수용체 또는 보체 결합 활성 또는 글리코실화 또는 이량체화를 감소시키거나 증대시키는 돌연변이를 함유함으로써, 생성된 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미친다. 예를 들어, Fc 수용체에 대한 결합을 감소시키는 돌연변이를 함유하는 면역글로불린 도메인이 사용되어 Fc 수용체-보유 세포에 대한 결합 활성이 더 낮은 본 발명의 융합 단백질 복합체를 생성할 수 있으며, 이는 특정 항원을 인식 또는 검출하도록 설계된 시약에 유리할 수 있다.

[0216]

핵산 및 벡터

[0217]

본 발명은 본 융합 단백질(예를 들어, TxM의 성분)을 인코딩하는 핵산 서열 및 특히 DNA 서열을 추가로 제공한다. 바람직하게는, DNA 서열은 과지, 바이러스, 플라스미드, 과지미드, 코스미드, YAC, 또는 에피솜과 같은 염색체 외 복제에 적합한 벡터에 의해 운반된다. 특히, 원하는 융합 단백질을 인코딩하는 DNA 벡터는 본원에 기재된 제조 방법을 용이하게 하고 상당한 양의 융합 단백질을 수득하기 위해 사용될 수 있다. DNA 서열은 적절한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질-코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 벡터 내에 삽입될 수 있다. 단백질-코딩 서열을 발현시키기 위해 다양한 숙주-벡터 시스템이 이용될 수 있다. 이들은 바이러스(예를 들어, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스 등)에 감염된 포유류 세포 시스템; 바이러스(예를 들어, 바콜로바이러스)에 감염된 곤충 세포 시스템; 효모 벡터를 함유하는 효모, 또는 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질 전환된 박테리아와 같은 미생물을 포함한다. 이용된 숙주-벡터 시스템에 따라, 다수의 적합한 전사 및 번역 요소 중 임의의 하나가 사용될 수 있다. 상기 문헌[Sambrook et al., 및 Ausubel et al.] 참고.

[0218]

가용성 융합 단백질 복합체를 제조하는 방법이 본 발명에 포함되며, 방법은 본원에 기재된 바와 같이 제1 및 제2 단백질을 인코딩하는 DNA 벡터를 숙주 세포 내에 도입하는 것, 세포 또는 배지에서 융합 단백질을 발현시키고 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 사이의 회합을 가능하게 하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하의 배지 중에서 숙주 세포를 배양하는 것, 숙주 세포 또는 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 것을 포함한다.

[0219]

일반적으로, 본 발명에 따른 바람직한 DNA 벡터는 5'에서 3' 방향으로 이펙터 분자를 인코딩하는 서열에 작동 가능하게 연결된, 생물학적 활성 폴리펩타이드를 인코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열의 도입을 위한 제1 클로닝 부위를 포함하는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0220]

DNA 벡터에 의해 인코딩된 융합 단백질 성분은 카세트 포맷으로 제공될 수 있다. 용어 "카세트"는 표준 제조합 방법에 의해 각각의 성분이 또 다른 성분으로 쉽게 치환될 수 있음을 의미한다. 특히, 카세트 포맷으로 구성된 DNA 벡터는 인코딩된 융합 단백질 복합체가 혈청형을 발달시킬 능력을 가질 수 있거나 가지는 병원체에 대해 사용되기 위한 것일 때 특히 바람직하다.

[0221]

융합 단백질 복합체를 코딩하는 벡터를 제조하기 위해, 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 적합한 리가제를 사용함으로써 이펙터 펩타이드를 코딩하는 서열에 연결된다. 제공하는 펩타이드를 코딩하는 DNA는 적합한 세포주와 같은 천연 공급원으로부터 DNA를 단리함으로써 또는 알려진 합성 방법, 예를 들어, 포스페이트 트리에스테르 방법에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984)] 참고. 합성 올리고뉴클레오타이드는 또한 상업적으로 이용 가능한 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하여 제조될 수 있다. 일단 단리되면, 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자는 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 또는 당업계에 알려진 다른 수단에 의해 증폭될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩타이드 유전자를 증폭시키기에 적합한 PCR 프라이머는 PCR 산물에 제한 부위를 추가할 수 있다. PCR 산물은 바람직하게는 생물학적 활성 폴리펩타이드-이펙터 융합 복합체의 적절한 발현 및 분비에 필요한 이펙터 펩타이드 및 리더 서열을 위한 스플라이스 부위를 포함한다. PCR 산물은 또한 바람직하게는 링커 서열을 코딩하는 서열, 또는 이러한 서열의 연결을 위한 제한 효소 부위를 포함한다.

[0222]

본원에 기재된 융합 단백질은 바람직하게는 표준 제조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 예를 들어, 일단 생물학적 활성 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 분자가 단리되면, 서열은 이펙터 폴리펩타이드를 인코딩하는 또 다른 DNA

분자에 연결될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 이펙터 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열에 직접 연결될 수 있거나, 더욱 전형적으로, 본원에서 논의된 링커 서열을 코딩하는 DNA 서열이 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열과 이펙터 펩타이드를 코딩하는 서열 사이에 있을 수 있으며 적합한 리가제를 사용하여 연결될 수 있다. 생성된 하이브리드 DNA 분자는 융합 단백질 복합체를 생산하기 위해 적합한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. DNA 분자는, 연결 후, 인코딩된 폴리펩타이드의 번역 프레임이 변경되지 않도록(즉, DNA 분자가 인-프레임(in-frame)으로 서로 연결됨) 5'에서 3' 방향으로 서로 연결된다. 생성된 DNA 분자는 인-프레임 융합 단백질을 인코딩한다.

[0223] 다른 뉴클레오타이드 서열 또한 유전자 작제물에 포함될 수 있다. 예를 들어, 이펙터 펩타이드에 융합된 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열의 발현을 제어하는, 프로모터 서열, 또는, 융합 단백질을 세포 표면 또는 배양 배지로 안내하는, 리더 서열이 작제물에 포함되거나 작제물이 삽입되는 발현 벡터에 존재할 수 있다. 면역글로불린 또는 CMV 프로모터가 특히 바람직하다.

[0224] 변이체 생물학적 활성 폴리펩타이드, IL-15, IL-15R α 또는 Fc 도메인 코딩 서열을 수득함에 있어서, 당업자는 폴리펩타이드가 특정 아미노산 치환, 첨가, 결실, 및 번역-후 변형에 의해, 생물학적 활동의 손실 또는 감소 없이, 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 구체적으로, 보존적 아미노산 치환, 즉 유사한 크기, 전하, 극성 및 입체 형태의 또 다른 아미노산으로 하나의 아미노산을 치환하는 것은 단백질 기능을 유의하게 변경시킬 가능성이 낮다는 것이 잘 알려져 있다. 단백질의 구성 성분인 20 개의 표준 아미노산은 다음과 같이 4 개의 보존적 아미노산 군으로 크게 분류될 수 있다: 비극성(소수성) 군은 알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판 및 발린을 포함하고; 극성(비하전된, 중성) 군은 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함하고; 양으로 하전된(염기성) 군은 아르기닌, 히스티딘 및 라이신을 함유하고; 음으로 하전된(산성) 군은 아스파르트산 및 글루탐산을 함유한다. 동일한 군 내에서 하나의 아미노산이 또 다른 아미노산으로 단백질 내 치환되는 것은 단백질의 생물학적 활성에 부정적 영향을 미칠 가능성이 낮다. 다른 경우에, 단백질의 생물학적 활성을 감소시키거나 향상시키기 위해 아미노산 위치에 대한 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 변화는 표적화된 잔기(들)의 알려진 또는 추정된 구조적 또는 기능적 특성에 기반하여 무작위로 또는 부위-특이적 돌연변이를 통해 도입될 수 있다. 변이체 단백질의 발현 후, 변형으로 인한 생물학적 활성의 변화는 결합 또는 기능 분석을 사용하여 용이하게 평가될 수 있다.

[0225] 뉴클레오타이드 서열 간의 상동성은 DNA 혼성화 분석에 의해 결정될 수 있으며, 여기서 이중-가닥 DNA 하이브리드의 안정성은 발생하는 염기쌍의 범위에 의해 좌우된다. 고온 및/또는 낮은 염 함량의 조건은 하이브리드의 안정성을 감소시키고, 선택된 상동성 정도 미만을 갖는 서열의 어닐링을 방지하기 위해 달라질 수 있다. 예를 들어, 약 55%의 G-C 함량을 갖는 서열의 경우, 40 내지 50C, 6xSSC(소듐 클로라이드/소듐 시트레이트 완충액) 및 0.1% SDS(소듐 도데실 살레이트)의 혼성화 및 세척 조건은 약 60 내지 70% 상동성을 나타내고, 50 내지 65C, 1xSSC 및 0.1% SDS의 혼성화 및 세척 조건은 약 82 내지 97% 상동성을 나타내고, 52C, 0.1xSSC 및 0.1% SDS의 혼성화 및 세척 조건은 약 99 내지 100% 상동성을 나타낸다. 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 비교(및 상동성 정도를 측정)하기 위한 광범위한 컴퓨터 프로그램이 또한 이용 가능하고, 상업적으로 이용 가능한 것 및 무료 소프트웨어 둘 모두의 공급원을 제공하는 목록은 문헌[Ausubel et al.(1999)]에 나타난다. 용이하게 이용 가능한 서열 비교 및 다중 서열 정렬 알고리즘은, 각각, 기본 국소 정렬 탐색 툴(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)(Altschul et al., 1997) 및 ClustalW 프로그램이다. BLAST는 월드 와이드 웹 상 ncbi.nlm.nih.gov에서 이용 가능하며 ClustalW 버전은 2.ebi.ac.uk에서 이용 가능하다.

[0226] 융합 단백질의 성분은 각각이 의도된 기능을 수행할 수 있다면 거의 임의의 순서로 조직될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 생물학적 활성 폴리펩타이드는 이펙터 분자의 C 또는 N 말단에 위치된다.

[0227] 본 발명의 바람직한 이펙터 분자는 이를 도메인이 의도된 기능에 도움이 되는 크기를 가질 것이다. 본 발명의 이펙터 분자는 제조되고 잘-알려진 화학적 가교 방법을 포함하는 다양한 방법에 의해 생물학적 활성 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Means, G. E. and Feeney, R. E. (1974) in *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day] 참고. 문헌[S. S. Wong (1991) in *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press]도 참고. 그러나, 인-프레임 융합 단백질을 제조하기 위해 재조합 조작을 사용하는 것이 일반적으로 바람직하다.

[0228] 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 융합 분자 또는 접합체 분자는 몇몇 방식으로 조직될 수 있다. 예시적인 구성에서, 생물학적 활성 폴리펩타이드의 C-말단은 이펙터 분자의 N-말단에 작동 가능하게 연결된다. 이 연결은 원하는 경우 재조합 방법에 의해 달성될 수 있다. 그러나, 또 다른 구성에서, 생물학적 활성 폴리펩타이드의 N-

말단은 이펙터 분자의 C-말단에 연결된다.

[0229] 대안적으로, 또는 추가로, 하나 이상의 추가의 이펙터 분자가 필요에 따라 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 접합체 복합체 내에 삽입될 수 있다.

벡터 및 발현

[0231] 본 발명의 융합 단백질 복합체(예를 들어, TxM)의 성분을 발현시키기 위해 다수의 전략이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 복합체의 하나 이상의 성분을 인코딩하는 작제물은 작제물의 삽입 후 연결을 위해 벡터 내 절단을 만드는 제한 효소를 사용하여 적합한 벡터 내로 편입될 수 있다. 이어서 유전자 작제물을 함유하는 벡터는 융합 단백질의 발현을 위해 적합한 숙주 내로 도입된다. 일반적으로 상기 문헌[Sambrook et al.] 참고. 적절한 벡터의 선택은 클로닝 프로토콜 관련된 인자에 기반하여 경험적으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 벡터는 사용되고 있는 숙주와 양립 가능하고, 이에 대한 적절한 래플리콘을 가져야 한다. 벡터는 발현될 융합 단백질 복합체를 코딩하는 DNA 서열을 수용할 수 있어야 한다. 적합한 숙주 세포는 진핵 세포 및 원핵 세포, 바람직하게는 쉽게 형질 전환될 수 있고 배양 배지에서 빠른 성장을 나타내는 세포를 포함한다. 구체적으로, 바람직한 숙주 세포로는 *이. 콜라이*, *바실러스 서브틸루스(Bacillus subtilis)* 등과 같은 원핵 생물, 및 동물 세포 및 효모 균주, 예를 들어 *에스. 세레비지애(S. cerevisiae)*와 같은 진핵 생물이 포함된다. 포유류 세포, 특히 J558, NS0, SP2-0 또는 CHO가 일반적으로 바람직하다. 다른 적합한 숙주는 예를 들어 SF9와 같은 곤충 세포를 포함한다. 통상적인 배양 조건이 사용된다. 상기 문헌[Sambrook] 참고. 이어서 안정한 형질 전환 또는 형질 감염된 세포주가 선택될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체를 발현하는 세포는 알려진 절차에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린에 연결된 융합 단백질 복합체의 발현은 연결된 면역글로불린에 특이적인 ELISA 및/또는 면역 블로킹에 의해 결정될 수 있다. IL-15 또는 IL-15Ra 도메인에 연결된 생물학적 활성 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질의 발현을 검출하는 다른 방법이 실시예에 개시되어 있다.

[0232] 상기 일반적으로 언급된 바와 같이, 숙주 세포는 원하는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산을 전파하기 위한 제조 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 숙주 세포는 융합 단백질의 생산이 구체적으로 의도된 원핵 또는 진핵 세포를 포함할 수 있다. 따라서 숙주 세포는 구체적으로 융합체를 인코딩하는 핵산을 전파할 수 있는 효모, 파리, 벌레, 식물, 개구리, 포유류 세포 및 기관을 포함한다. 사용될 수 있는 포유류 세포주의 비-제한적 예로는 CHO dhfr-세포(Urlaub and Chas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216(1980)), 293 세포(Graham et al., *J Gen. Virol.*, 36:59(1977)) 또는 SP2 또는 NS0와 같은 골수종 세포(Galfre and Milstein, *Meth. Enzymol.*, 73(B):3(1981))가 포함된다.

[0233] 원하는 융합 단백질 복합체를 인코딩하는 핵산을 전파할 수 있는 숙주 세포는 곤충(예를 들어, *에스피. 프루지 페르다(Sp. frugiperda)*), 효모(예를 들어, *에스. 세레비지애*, *에스. 품베(S. pombe)*, *파. 파스토리스(P. pastoris.)*, *케이. 락티스(K. lactis)*, *에이치. 폴리모르파(H. polymorpha)*; 문헌[Fleer, R., *Current Opinion in Biotechnology*, 3(5):486496(1992)]에 의해 일반적으로 검토됨), 진균 및 식물 세포를 포함하는 비-포유류 진핵 세포 또한 포함한다. *이. 콜라이* 및 *바실러스(Bacillus)*와 같은 특정 원핵 생물이 또한 고려된다.

[0234] 원하는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산은 세포를 형질 감염시키기 위한 표준 기술에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 용어 "형질 감염시키는" 또는 "형질 감염"은 칼슘 포스페이트 공-침전, DEAE-덱스트란-매개 형질 감염, 리포펙션, 전기 천공, 미세 주입, 바이러스 형질 도입 및/또는 통합을 포함하여, 숙주 세포 내로 핵산을 도입하기 위한 모든 통상적인 기술을 포함하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질 감염시키는 적합한 방법은 상기 문헌[Sambrook et al.] 및 다른 실험실 교과서에서 찾을 수 있다.

[0235] 다양한 프로모터(전사 개시 조절 영역)가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 적절한 프로모터의 선택은 제안된 발현 숙주에 의해 좌우된다. 이종 공급원 유래 프로모터는 선택된 숙주에서 기능하는 한 사용될 수 있다.

[0236] 프로모터 선택은 또한 원하는 효율, 및 펩타이드 또는 단백질 생산 수준에 의해 좌우된다. tac과 같은 유도성 프로모터는 *이. 콜라이*에서 단백질 발현 수준을 극적으로 증가시키기 위해 종종 사용된다. 단백질의 과발현은 숙주 세포에 유해할 수 있다. 결과적으로, 숙주 세포 성장이 제한될 수 있다. 유도성 프로모터 시스템의 사용은 유전자 발현의 유도 전에 숙주 세포가 허용 가능한 밀도로 배양될 수 있게 함으로써, 더 높은 생산 수율을 촉진한다.

[0237] 다양한 신호 서열이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩타이드 코딩 서열과 상동성이 신호 서열이 사용될 수 있다. 대안적으로, 발현 숙주 내 효율적인 분비 및 가공을 위해 선택되거나 설계된 신호 서열이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 신호 서열/숙주 세포 쌍으로는 *비. 서브틸리스*에서의 분비를 위한

비. 서브틸리스 *sacB* 신호 서열, 및 사카로마이세스 세레비지에 α -접합 인자 또는 피. 파스토리스 분비를 위한 피. 파스토리스 산 포스파타제 *phoI* 신호 서열이 포함된다. 신호 서열은 신호 펩티다제 절단 부위를 인코딩하는 서열을 통해 단백질 코딩 서열에 직접 연결되거나, 통상적으로 10 개 미만의 코돈으로 구성된 짧은 뉴클레오타이드 브릿지를 통해 연결될 수 있으며, 여기서 브릿지는 다운스트림 TCR 서열의 옳은 판독 프레임을 보장한다.

[0238] 전사 및 번역을 향상시키는 요소는 진핵 생물 단백질 발현 시스템에 대해 확인되었다. 예를 들어, 이종 프로모터의 양쪽에 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 프로모터 1,000 bp를 위치시키면 식물 세포에서 전사 수준이 10 내지 400 배만큼 상승될 수 있다. 발현 작제물은 또한 적절한 번역 개시 서열을 포함해야 한다. 적절한 번역 개시를 위한 코작(Kozak) 컨센서스 서열을 포함하도록 발현 작제물을 변형하는 것은 번역 수준을 10 배만큼 증가시킬 수 있다.

[0239] 발현 작제물의 일부이거나 그것으로부터 분리될 수 있는(예를 들어, 발현 벡터에 의해 운반됨) 선택 마커는, 관심있는 유전자와 상이한 부위에 마커가 통합될 수 있도록 종종 사용된다. 예는 항생제에 대한 저항성을 부여하는 마커(예를 들어, *bla*는 이. 콜라이 숙주 세포에 대해 암페실린 저항성을 부여함, *nptII*는 매우 다양한 원핵 및 진핵 세포에 카나마이신 저항성을 부여함) 또는 숙주가 최소 배지에서 자랄 수 있게 하는 마커(예를 들어, *HIS4*는 히스티딘 부재 시 피. 파스토리스 또는 *His⁻* 에스. 세레비지에가 성장하는 것을 가능하게 함)를 포함한다. 선택 가능한 마커는 마커의 독립적인 발현을 가능하게 하기 위해 자체 전사 및 번역 개시 및 종결 조절 영역을 갖는다. 항생제 저항성이 마커로서 사용되는 경우, 선택을 위한 항생제의 농도는 항생제에 따라 달라질 것이고, 일반적으로 10 내지 600 μg 의 항생제/배지 mL이다.

[0240] 발현 작제물은 알려진 재조합 DNA 기술을 이용하여 조립된다(Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999). 제한 효소 분해 및 연결은 DNA의 두 단편을 연결하는 데 사용되는 기본 단계이다. DNA 단편의 말단은 연결 전에 변형을 필요로 할 수 있고, 이는 돌출부를 채우거나, 단편의 말단 부분을 뉴클레아제(예를 들어, ExoIII)로 제거하거나, 부위 지향적 돌연변이 유발, 또는 PCR에 의해 새로운 염기쌍을 첨가함으로써 달성될 수 있다. 선택된 단편의 연결을 용이하게 하기 위해 폴리링커 및 어댑터가 사용될 수 있다. 발현 작제물은 전형적으로 이. 콜라이의 제한, 연결, 및 형질 전환의 라운드를 사용하는 단계에서 조립된다. 발현 작제물의 구축에 적합한 다수의 클로닝 벡터는 당업계에 알려져 있고(λ ZAP 및 pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc., Madison, WI, 문헌[Ausubel et al., 1999]에서 인용됨) 구체적인 선택은 본 발명에 중요하지 않다. 클로닝 벡터의 선택은 발현 작제물을 숙주 세포로 도입하기 위해 선택된 유전자 전달 시스템에 의해 영향을 받을 것이다. 각각의 단계의 끝에서, 생성된 작제물은 제한, DNA 서열, 혼성화 및 PCR 분석에 의해 분석될 수 있다.

[0241] 발현 작제물은 클로닝 벡터 작제물로서, 선형 또는 원형으로, 숙주 내로 형질 전환될 수 있거나, 클로닝 벡터로부터 제거되고 그대로 사용되거나 전달 벡터로 도입될 수 있다. 전달 벡터는 선택된 숙주 세포 유형에서 발현 작제물의 도입 및 유지를 용이하게 한다. 발현 작제물은 다수의 알려진 유전자 전달 시스템(예를 들어, 자연적 능력, 화학적 매개된 형질 전환, 원형질체 형질 전환, 전기 천공, 유전자총법 형질 전환, 형질 감염, 또는 커뮤게이션) 중 임의의 것에 의해 숙주 세포 내로 도입된다(Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989). 선택된 유전자 전달 시스템은 사용된 숙주 세포 및 벡터 시스템에 의해 좌우된다.

[0242] 예를 들어, 발현 작제물은 원형질체 형질 전환 또는 전기 천공에 의해 에스. 세레비지에 세포 내로 도입될 수 있다. 에스. 세레비지에의 전기 천공은 용이하게 달성되고, 스페로플라스트 형질 전환에 유사한 형질 전환 효율을 산출한다.

[0243] 본 발명은 추가로 관심 융합 단백질을 단리하기 위한 생산 과정을 제공한다. 과정에서, 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 관심 단백질을 인코딩하는 핵산이 도입된, 숙주 세포(예를 들어, 효모, 진균, 곤충, 박테리아 또는 동물 세포)는 관심 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 전사를 자극하는 배양 배지에서 생산 규모로 성장된다. 이어서, 관심 융합 단백질은 수확된 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 단리된다. 배지 또는 수확된 세포로부터 관심 단백질을 단리하기 위해 표준 단백질 정제 기술이 사용될 수 있다. 특히, 정제 기술은 롤러 병, 스피너(spinner) 플라스크, 조직 배양 플레이트, 생물 반응기, 또는 발효기를 포함하는 다양한 실행으로부터 원하는 융합 단백질을 대규모로(즉, 적어도 밀리그램 양으로) 발현하고 정제하는 데 사용될 수 있다.

[0244] 발현된 단백질 융합 복합체는 알려진 방법에 의해 단리 및 정제될 수 있다. 전형적으로 배양 배지가 원심 분리되거나 여과된 후 상청액은 친화성 또는 면역 친화성 크로마토그래피, 예를 들어 발현된 융합 단백질 복합체에 결합하는 단일 클론 항체의 사용을 포함하는 단백질-A 또는 단백질-G 친화성 크로마토그래피 또는 면역 친화성 프로토콜에 의해 정제된다. 본 발명의 융합 단백질은 알려진 기술의 적절한 조합에 의해 분리 및 정제될 수 있다. 이들 방법으로는, 예를 들어 염 침전 및 용매 침전과 같은 용해도를 이용하는 방법, 투석, 한외-여과, 젤-

여과, 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동과 같은 분자량의 차이를 이용하는 방법, 이온-교환 칼럼 크로마토그래피와 같은 전하의 차이를 이용하는 방법, 친화성 크로마토그래피와 같은 특이적 친화성을 이용하는 방법, 역상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 소수성의 차이를 이용하는 방법 및, 등전점 전기 영동, Ni-NTA와 같은 금속 친화성 칼럼과 같은, 등전점의 차이를 이용하는 방법이 포함된다. 이들 방법에 관한 개시 내용을 위해 일반적으로 상기 문헌[Sambrook et al. 및 Ausubel et al.] 참고.

[0245] 본 발명의 융합 단백질은 실질적으로 순수한 것이 바람직하다. 즉, 융합 단백질이 바람직하게는 적어도 80% 또는 90% 내지 95% 균질성(w/w)으로 존재하도록 천연적으로 수반하는 세포 치환체로부터 융합 단백질이 단리되었다. 적어도 98 내지 99% 균질성(w/w)을 갖는 융합 단백질이 다수의 약학적 적용, 임상 적용 및 연구 적용을 위해 가장 바람직하다. 일단 실질적으로 정제되면 융합 단백질은 치료적 적용을 위해 실질적으로 오염 물질이 없어야 한다. 일단 부분적으로 또는 실질적 순도로 정제되면, 가용성 융합 단백질은 치료적으로, 또는 본원에 개시된 시험관내 또는 생체내 분석을 수행하는 데 사용될 수 있다. 실질적 순도는 크로마토그래피 및 겔 전기 영동과 같은 다양한 표준 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0246] 본 발명의 융합 단백질 복합체는 암성이거나 감염되거나 하나 이상의 질병에 의해 감염될 수 있는 다양한 세포를 이용한 시험관내 또는 생체내 사용에 적합하다.

[0247] 인간 인터루킨-15(huIL-15)는 항원 제시 세포 상에 발현된 인간 IL-15 수용체 α 사슬(huIL-15R α)에 의해 면역 이팩터 세포에 트랜스-제시된다. IL-15R α 는 주로 세포외 스시 도메인(huIL-15R α Su)을 통해 huIL-15에 높은 친화성(38 pM)으로 결합한다. 본원에 기재된 바와 같이, huIL-15 및 huIL-15R α Su 도메인은 다중-도메인 융합 단백질 복합체를 구축하기 위한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.

[0248] IgG 도메인, 특히 Fc 단편은 승인된 생물학적 약물을 포함하는 다수의 치료 분자에 대한 이량체 스캐폴드로서 성공적으로 사용되어 왔다. 예를 들어, 에타너셉트는 인간 IgG1의 Fc 도메인에 연결된 가용성 인간 p75 종양 괴사 인자- α (TNF- α) 수용체(sTNFR)의 이량체이다. 이 이량체화는 에타너셉트로 하여금 단량체 sTNFR보다 TNF- α 활성을 저해하는 데에 있어 1,000 배까지 더 강력하게 하고 단량체 형태보다 5 배 더 긴 혈청 반감기를 갖는 융합체를 제공한다. 결과적으로, 에타너셉트는 생체내 TNF- α 의 염증유발 활성의 중화 및 다수의 상이한 자가 면역 적응증에 대한 환자 결과를 개선시키는 것에 있어서 효과적이다.

[0249] 이량체화 활성을 외에도, Fc 단편은 또한 자연 살해(NK) 세포, 호중구, 식세포 및 수지상 세포 상에 나타난 Fc γ 수용체와의 상호 작용, 및 보체 활성화를 통해 세포 독성 이팩터 기능을 제공한다. 항암 치료 항체 및 다른 항체 도메인-Fc 융합 단백질의 맥락에서, 이를 활성은 동물 종양 모델 및 암 환자에서 관찰되는 효능에 있어 중요한 역할을 할 가능성이 있다. 그러나 이들 세포 독성 이팩터 반응은 다수의 치료적 적용에 충분하지 않을 수 있다. 따라서, Fc 도메인의 이팩터 활성을 개선 및 확장시키는 데 상당한 관심이 있어 왔고, 표적화된 치료 분자를 통해 T 세포 활성을 포함하는, 세포 용해성 면역 반응을 질병 부위로 모집하는 다른 수단을 개발하는 데 상당한 관심이 있어 왔다. IgG 도메인은 전통적인 하이브리도마 융합 기술에 의해 생성된 생산물의 질 및 양을 개선시키기 위해 이중 특이적 항체를 형성하기 위한 스캐폴드로서 사용되어 왔다. 이들 방법은 다른 스캐폴드의 단점을 우회하지만, 임상 개발 및 사용을 지원하기에 충분한 수준으로 포유류 세포에서 이중 특이적 항체를 생산하는 것은 어려웠다.

[0250] 인간-유래 면역 자극성 다량체 스캐폴드를 개발하기 위해, 인간 IL-15(huIL-15) 및 IL-15 수용체 도메인이 사용되었다. huIL-15는 높은 결합 친화도(약 10^{-11} M의 평형 해리 상수(KD))로 huIL-15 수용체 α -사슬(huIL-15R α)과 결합하는 작은 4 개의 α -나선 다발 사이토카인 패밀리의 구성원이다. 이어서 생성된 복합체는 T 세포 및 NK 세포의 표면 상에 나타나는 인간 IL-2/15 수용체 β/γ 사슬(huIL-15R β/γ) 복합체에 트랜스-제시된다. 이 사이토카인/수용체 상호 작용은, 바이러스 감염된 세포 및 악성 세포를 근절하는 데 중요한 역할을 하는, 이팩터 T 세포 및 NK 세포의 팽창 및 활성화를 초래한다. 정상적으로, huIL-15 및 huIL-15R α 는 수지상 세포에서 공동-생산되어 이후에 분비되고 세포 표면 상에 이중이량체 분자로서 나타나는 복합체를 세포내에서 형성한다. 따라서, huIL-15 및 huIL-15R α 상호 작용의 특성은 이들 사슬 간 결합 도메인이 가용성 이량체 분자로 하여금 표적-특이적 결합을 할 수 있도록 하는 인간-유래 면역 자극 스캐폴드로서 작용할 수 있음을 시사한다.

[0251] 본 발명의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 통상의 기술자의 이해 범위 내에 있는, 분자 생물학(제조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용한다. 이러한 기술은 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental

"Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)]과 같은 문헌에서 충분히 설명된다. 이들 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드의 생산에 적용 가능하며, 따라서 본 발명의 제조 및 실시에서 고려될 수 있다. 구체적인 구현예에 대해 특히 유용한 기술이 하기 섹션에서 논의될 것이다.

[0252] 하기 실시예는 당업자에게 본 발명의 분석, 스크리닝, 및 치료 방법을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되며, 본 발명가들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0253] 실시예

[0254] 실시예 1: IL-15, IL-12 및 IL-18 도메인을 포함하는 융합 단백질 복합체의 생성 및 특징 확인

[0255] 암 또는 감염성 질병을 치료하기 위한 중요한 치료 접근은 면역 세포에 대한 면역 세포 활성을 증대시키는 것에 의존한다. 이 전략은 생체외에서 면역 세포를 자극한 후 입양 전달하는 것 및/또는 환자의 생체내에서 면역 세포 수준 또는 활성을 직접적으로 증가시키는 것을 포함한다. 이들 접근에 관여하는 면역 세포는 선천적 면역 세포(즉, NK 세포) 또는 적응성 면역 세포(즉, T 세포) 면역계의 면역 세포일 수 있다.

[0256] 면역 활성을 증대시키기 위한 하나의 접근은 면역 자극 사이토카인을 면역 세포에 제공하는 것이다. 이러한 사이토카인은 당업계에 알려져 있으며 단독으로 사용되거나, 다른 사이토카인 또는 제제와 조합하여 사용될 수 있다. 하기에 상세히 기재된 바와 같이, IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 융합 단백질 복합체를 생성하였다(도 1a 및 도 1b). 이를 융합 단백질 복합체는 NK 세포에 결합하는 것, 각각의 사이토카인 수용체를 통해 세포 반응을 신호 전달하는 것에 있어 이점을 갖는다. Ig 분자의 Fc 영역은 이량체를 형성하여 가용성 다중-폴리펩타이드 복합체를 제공하고, 정제 목적으로 단백질 A에 결합할 수 있고 NK 세포 및 대식세포 상의 Fc γ 수용체와 상호 작용할 수 있어서, 개별 사이토카인의 조합으로 존재하지 않는 융합 단백질 복합체에 이점을 제공한다. 추가로, IL-15N72D와 IL-15R α Su 도메인 사이의 상호 작용은 IL-15N72D, IL-12 및 IL-18(및 아마도 다른 단백질 도메인 또는 제제)을 단일 면역 자극 융합 단백질 복합체로 연결하는 수단을 제공한다.

[0257] 구체적으로, IL-12 및/또는 IL-18 도메인을 IL-15N72D 및 IL-15R α Su/Fc 사슬에 연결하는 작제물을 제조하였다. IL-12의 경우, 성숙 사이토카인은 가요성 링커 서열을 통해 연결되어 활성 단일-사슬 형태를 생성할 수 있는 2개의 폴리펩타이드 서브유닛(p40 및 p35)으로 구성된다. 일부 경우에, IL-12 또는 IL-18 폴리펩타이드는 IL-15N72D 및/또는 IL-15R α Su/Fc 사슬의 N-말단에 연결된다. 다른 경우에, IL-12 또는 IL-18 폴리펩타이드는 IL-15N72D 및/또는 IL-15R α Su/Fc 사슬의 N-말단에 연결된다. IL-12 및/또는 IL-18 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 특정 융합 단백질 복합체는 하기에 기재되어 있다.

[0258] 1) IL-12/IL-15R α Su/Fc 및 IL-18/IL-15N72D 융합 단백질을 포함하는 융합 단백질 복합체를 생성하였다. 인간 IL-12 서브유닛 서열 및 인간 IL-18 서열은 유니프로트(UniProt) 웹사이트로부터 획득하였으며, 이를 서열에 대한 DNA는 진위즈(Genewiz)에 의해 합성하였다. 구체적으로, IL-12 서브유닛 베타(p40)를 IL-12 서브유닛 알파(p35)에 연결하여 단일 사슬 베전의 IL-12를 생성한 다음 IL-12 서열을 IL-15R α Su/Fc 사슬에 직접 연결하는 작제물을 제조하였다. 합성된 IL-12 서열을 중첩 PCR을 통해 IL-15R α Su/Fc의 N-말단 코딩 영역에 연결시켰다. IL-15R α Su/Fc의 N-말단에 연결된 IL-12를 포함하는 작제물의 핵산 및 단백질 서열을 하기에 나타내었다.

[0259] IL-12/IL-15R α Su/Fc 작제물의 핵산 서열(신호 웨პ타이드 서열 포함)은 다음과 같다(SEQ ID NO: 1):

[0260] (신호 웨პ타이드)

[0261] atgaagtgggtgaccttcatcagcctgctgtccctgttcaggcgctactcc

[0262] (인간 IL-12 서브유닛 베타(p40))

atcigggaggtaaaaaacgttgtatgcgtggactggatctctgacgccccccggcgagatgggtgtgtacalgcacatgcac
accctctgaggaggatggcatcacatggaccctggaccataaggcagcgagggtgtgggtccggaaagaccctgaccatccaggta
aggagtctggcgacgcggccaggataacctccataaggaggcgagggtgtgtccactccctgtctctgtcacaagaaggaa
gatggcatctgggacccgatattctgaaggaccagaaggagccaaagaacaaaacccttctgggtgtcgagggcaagaattattcc
ggcagggttcacccctgtggctgaccacaatctccaccggaccctgcacccctcaggtcaagagctccagggtatccatccatcagg
gcgtgcacccctgtggactgcacccctgtccgtgagggtgagggcgacaacaaggagtacgagttactccgtcgagtgtcagga
ggacitccgcctccctgtccgagaagagactgcctatcgaagatcatgtggacccgtgtcacaagctgaagatgagaactacac
cagcagcttcatccggacattatcaaggctgtccctcaagaaacctgcagctcaaggccctgtgaagaattccggcaagtcag
gtgtccctgggatgtcccccacccctgtccctactctatttactgcctgaccctgtcggtgcagggtcagggcaagagcaaga
gggagaagaaagacccgggttgcacccgacaagaccagcgtaccctgtatgtcggtgtcagaacacgttccattccgtcggtgtcag
gacaggattactccctctgtccgtgtggctagctccctgtcag

[0263] (링커)

[0265] ggagggtggcggtccggagggtggagggtctgggtggagggtggagg

[0266] (인간 IL-12 서브유닛 알파(p35))

agaacacctgcctggctacacccgaccctggatgtccctgtccaccacagccaaaccctctggggccgtgtccaacatg
ctgcaaaaaggctcgccagacactggagttctccctgtcaccaggcaggagatcgaccatgaggacatcacaaggacaagacaa
gcaccgtggaggctgcctcccccgtgaactgaccaagaatgagtccctgcctcaacagccggagacatccatcacaatggct
ctgtctggctcccggaagacaagctcatgtgcccctgtccctgcctcagcatatgaggacctgaagatgtaccagggtcagttaa
gaccatgaacgcgaactgtgtatggaccctaagccgaatctccctggaccagaacatgtggctgtgatcgacgagctgtatgca
ggctgtcaacccgagccgtgccccagaaatccctggaggagccctgatttacaagacaaaatcaagctgtcatcc
*tccctgcacccctccggatcaggccgtgaccatcgtcggtgtatgtccctactgtatgtcc

[0269] (인간 IL-15R α 스시 도메인)

atcacgtgtccctctatgtccgtgtgaacacgcagacatctgggtcaagagactacagctgtactccaggagggtacattgtaa
tcgtgttcaagcgtaaaaggccgcacgtccacgcctgacggagtgcgtgtgaccaaggccacgaatgtgcccacggacaaccccc
agtctcaaatgcattagA

[0271] (인간 IgG1 CH2-CH3(Fc) 도메인)

gagcccaaacttgtgacaaaactcacacatgcacccatgtgcccagaccgtgaactctggggggaccgtcagttcccttcccc
caaaaaccaaggacacccctcatgtatcccgacccctgagggtcacaatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgagggt
aagtctcaacttgtgtatggacccgcgtggagggtgtcataatgccaagacaaaagccgcggggaggaggactacaacagcagtcaccgt
tggtcagctgcctccctgtcaccaggactgtgtccaaagggttacaatgtgtcaagggttcccaacaaaggccctcccgacc
ccatcgaaaaaccatctccaaaggccaaaggccgagcccgagaaccacagggtacaccctgtcccgatccggatgagctgac
caagaaccaggctcgtccctgtgtggactccgtggacccgttcccttcccttccctgtcccaacaaaggctcaccgtggacaagagg
ggcagcaggaaacgttccatgtccctgtatgtccgttccctgtccctgtcccaacccactacacccgttccctgtccctgt

[0272] taaa

[0273] IL-12/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질의 아미노산 서열(신호 펩타이드 서열 포함)은 다음과 같다(SEQ ID NO: 2):

[0274] (신호 펩타이드)

[0275] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0276] (인간 IL-12 서브유닛 베타(p40))

IWEKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWLDSSEVLGSGKTLTIQ
VKEFGDAGQYTCHKGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK
NYSGRFTCWWTIISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV
ECQEDSACPAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPLKNLQLKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYYSSSWSEWASVPC

[0278] (링커)

[0279] GGGGSGGGGSGGGGS

[0280] (인간 IL-12 서브유닛 알파(p35))

```
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSUYEDLKMYQVE
FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEPDFYTKIK
```

[0281] LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[0282] (인간 IL-15R a 스시 도메인)

```
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT
TPSLKCIR
```

[0284] (인간 IgG1 CH2-CH3(Fc) 도메인)

```
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTIKAKGQPQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAWEWSNG
QOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQKSL
```

[0285] SLSPGK

[0286] 일부 경우에, 리더 웨타이드가 온전한 폴리웨타이드로부터 절단되어 가용성이거나 분비될 수 있는 성숙한 형태를 생성한다.

[0287] 합성된 IL-18 서열을 중첩 PCR을 통해 IL-15N72D의 N-말단 코딩 영역에 연결시키는 작제물도 제조하였다. IL-15N72D의 N-말단에 연결된 IL-18을 포함하는 작제물의 핵산 및 단백질 서열을 하기에 나타내었다.

[0288] IL-18/IL-15N72D 작제물(리더 서열 포함)의 핵산 서열은 다음과 같다(SEQ ID NO: 3):

[0289] (신호 웨타이드)

[0290] a t g a a g t g g g t g a c c t t c a t c a g c c t g c t g t c c a g c g c c t a c t c c

[0291] (인간 IL-18)

```
tac t c g c a a g c t g g a g t c c a a g c t g t c c g t g a t c a g g a a c c t g a a c g a c c a g g t c t g c a c c a g g c c a g g
t t c g a g g a c a t g a c c g a c t c c g a c t g c a g g a c a c g c c c t a g g a c c a t t c t c a t g t a a g g a c a g g c a g g c c a g g
g g a a t g c c g t g a c c a t c t c c g t g a a g a g a g a t c t c c a c c t g t c c t g c g a g a c a a g a t c a t c t c t c a a g g a g a t g a a c c
c c c c c g a a c a c a t c a g g a c a c a a g t c c g a c a t c a t t c t c c a g g g g t c c c t g c c c g g a c a c g a c a a c a a g a t g c a g t c g a g t
c c t c t c t a c g a g g g c t a c t t c t c g c c t g t g a g a a g g a g a g g a c c t t c t c a a g c t a t c t c t g a a g a a g g a g a c g a g e t g g g c g
```

[0292] a c a g g t t c c a t c a t g t c a c c g t g c a g a c a c g a g g a c

[0293] (인간 IL-15N72D)

```
a a c t t g g g t t a a c g t a a t g a a g g a t c t t a a t c a a t c t a g c a t a t t g a t g c t a c t t a a t c a g g a a a g t g a t g t t c
a c c c a g t t g c a a g a t t a a c a g c a a t g a a g t t c t t c t t g g a g g a t t a a t t c a c t t a g g t g a g g t c c c g a g a t t g c a a g t t a t t c a t g a t a c a
g t g a a a a t t a c t g a t c t c t a a c a a c g a c a g t t t g t c t t a a t g g g a a t g t a a c a g a a t t c t g g a t g t g a g g a a c t t g g a g
```

[0294] g a a a a a a t t a a a g a a t t t t g c a g a g t t t g t a c a t a t t g t c c a a a t g t t c a t c a a c t t c t

[0295] IL-18/IL-15N72D 융합 단백질(리더 서열 포함)의 아미노산 서열은 다음과 같다(SEQ ID NO: 4):

[0296] (신호 웨타이드)

[0297] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0298] (인간 IL-18)

```
YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPR
GMAVTISKCEKISTLSCENKIISFKEMNPDDNIKDTKSDIIFQRSPVGHDNKMQFESS
SYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED
```

[0300] (인간 IL-15N72D)

```
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA MKCFLLELQVISLESGDAS
IHDTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
```

[0302] 일부 경우에, 리더 웨타이드가 온전한 폴리웨타이드로부터 절단되어 가용성이거나 분비될 수 있는 성숙한 형태를 생성한다.

- [0303] IL-12/IL-15R α Su/Fc 및 IL-18/IL-15N72D 작제물을 이전에 기재된 바(본원에 참조로서 포함된, 미국 특허 번호 8,507,222의 실시예 1)와 같이 발현 벡터 내에 클로닝하고, 발현 벡터를 CHO 세포로 형질 감염시켰다. CHO 세포에서의 2 개의 작제물의 공동-발현은 가용성 IL-18/IL-15N72D:IL-12/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체(hIL18/IL12/TxM으로 지칭됨)의 형성 및 분비를 가능하게 하였다. hIL18/IL12/TxM 단백질을 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제하여 IL-12/IL-15R α Su/Fc 이량체 및 IL-18/IL-15N72D 융합 단백질로 구성된 가용성(비-응집) 융합 단백질 복합체를 생성하였다(도 2a 내지 도 2c).
- [0304] 단백질 A-정제된 IL-18/IL-15N72D:IL-12/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체의 환원된 SDS-PAGE 분석을 도 3에 나타내었다. 약 90 kDa 및 약 30 kDa에서 각각 가용성 IL-12/IL-15R α Su/Fc 및 IL-18/IL-15N72D 단백질에 상응하는 밴드를 관찰하였다(도 3).
- [0305] 2) 제2 접근의 경우, IL-18/IL-15R α Su/Fc 및 IL-12/IL-15N72D 융합 단백질을 포함하는 유사한 융합 단백질 복합체를 생성하였다. 구체적으로, IL-18을 IL-15R α Su/Fc 사슬에 직접 부착시켜 작제물을 제조하였다. 합성된 IL-18은 중첩 PCR을 통해 IL-15R α Su/Fc의 N-말단 코딩 영역에 연결된다. IL-15R α Su/Fc의 N-말단에 연결된 IL-18을 포함하는 작제물의 핵산 및 단백질 서열을 하기에 나타낸다.
- [0306] IL-18/IL-15R α Su/Fc 작제물의 핵산 서열(신호 펩타이드 서열 포함)은 다음과 같다(SEQ ID NO: 5):
- [0307] (신호 펩타이드)
- [0308] atgaagtggtgaccttcatcagccctgtgtcctgttccaggcgccatctcc
- [0309] (인간 IL-18)
 tactcggcaagctggagtccaagctgtccgtgatcggaaacctgaacggcagggtgtcatcgaccaggggcaacaggcccctgttcc
 ttcgaggacatgacggactccgactgcgggacaacggcccttagggaccatcttcatactccatgtataaggacagccggccagg
 ggaatggccgtgaccatctccgtgaagtggggagaagatctccaccctgtccgtccggagaacaaggatcatctccatcaaggagatggacc
 ccccccggacaacatcaaggacaccaaggccgacatcatcttcacccgggtggccggacacgacaacaaggatgcaggatcgat
 ctccctccatcaggggctactttctggcgttgagaaggagaggacccttcatacgatctccatcttcagaagaaggaggacgatggccg
 acagggtccatcatgttccaccgtgcagaacggggac

[0310]

[0311] (인간 IL-15R α 스시 도메인)
 atcacgiglctccctatgtccgtggaaacacgcagacatctgggtcaagagactacagcttactccaggggagggtacatttttaac
 tctgggttcaagcgtaaaggccgcacgtccagcctgacggagtgcgttgttgaacaaggccacgaaatgtcgcccactggacaacccccc
 agtctcaaatgcatttga

[0312] (인간 IgG1 CH2-CH3(Fc) 도메인)
 gagccgaaatctgtgacaaaacccacatgcccaccgtgcccagccatgtgaactccctgggggaccgtcagtccttccttc
 caaaaaccaaggacaccctcatgttccggaccctgtggatccatgcgtgggtggacgtgagccacgaaaccctgagg
 aagtcaactgttacgtggacggcgtggagggtcataatgccaagacaaaggccggggaggaggcgttacaacacgcgtaccgt
 tggtcagcgtccatccgtccgtcaccaggactggcgtgaatggcaaggaggatcaatgcgttcaagggttcaccaaaaaggccctcc
 ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccggcagccggagaaccacagggttacccctgccccatccggatgagctgac
 caaaggccagggtcagccgtccgttgcataaaggccgttacccatccggcgtggggaggaggcaatggcagccgg
 agaacaactacaagaccacgcgtccgtgtggactccgcggccgttccatccatccatccatccatccatccatccatcc
 ggcagcaggggaaacgttctcatgttccgttgcgttgcgttgcataaccactacacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 taaa

[0313] IL-18/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질의 아미노산 서열(신호 펩타이드 서열 포함)은 다음과 같다(SEQ ID NO: 6):

[0314] (신호 펩타이드)

[0315] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0316] (인간 IL-18)
 YFGKLESKLSVIRNLNDQVLIDQGNRPLFEDMTSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPR
 GMAVTISVKCEKISTLSCENKIIISFKEMNPPDNKDTKSDIIFFQRSVPKGHDNMQFESS
 SYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED

[0340] (인간 IL-12 서브유닛 베타(p40))

IWEKKDVYVVELDWYPDAPGEMVLTCDTPEEDGITWLQDQSSEVLGSGKTLTIQ
VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK
NYSGRFTCWLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKYEYSV
ECQEDSACPAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPKPNLQLKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS

VRAQDRYYSSSWSEASVPCS

(링커)

GGGGSGGGGGGGGS

[0344] (인간 IL-12 서브유닛 알파(p35))

RNLPVATPDPMFPCCLHHQSNNLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETTSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE
FKTMNAKLLMDPDKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIK

LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[0346] (인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDHPSCKVTAMKCFLLQVISLESGDAS
IHDTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFIANTS

[0348] 일부 경우에, 리더 펩타이드가 온전한 폴리펩타이드로부터 절단되어 가용성이거나 분비될 수 있는 성숙한 형태를 생성한다.

[0349] IL-18/IL-15R α Su/Fc 및 IL-12/IL-15N72D 작제물을 이전에 기재된 바(본원에 참조로서 포함된, 미국 특허 번호 8,507,222의 실시예 1)와 같이 발현 벡터 내에 클로닝하고, 발현 벡터를 CHO 세포로 형질 감염시켰다. CHO 세포에서의 2 개의 작제물의 공동-발현은 가용성 IL-12/IL-15N72D:IL-18/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체(hIL12/IL18/TxM으로 지칭됨)의 형성 및 분비를 가능하게 하였고, 이는 단백질 A 친화성 및 다른 크로마토그래피 방법을 통해 정제될 수 있다.

[0350] 3) IL-18/IL-15R α Su/Fc 및 IL-18/IL-15N72D 융합 단백질을 포함하거나 IL-12/IL-15R α Su/Fc 및 IL-12/IL-15N72D 융합 단백질을 포함하는 유사한 융합 단백질 복합체를 생성할 수 있었다. IL-18/IL-15R α Su/Fc 및 IL-15N72D 융합 단백질 또는 IL-15R α Su/Fc 및 IL-18/IL-15N72D 융합 단백질을 포함하는 "양 방향" 융합 단백질 복합체를 생성할 수 있었다(도 1b). 마찬가지로, IL-12/IL-15R α Su/Fc 및 IL-15N72D 융합 단백질 또는 IL-15R α Su/Fc 및 IL-12/IL-15N72D 융합 단백질을 포함하는 "양 방향" 융합 단백질 복합체를 생성할 수 있었다. 이러한 복합체를 상기 기재된 바와 같이 생성하였다.

[0351] 실시예 2: hIL18/IL12/TxM 및 hIL12/IL18/TxM 융합 단백질 복합체의 활성을 대한 시험관내 특징 확인

[0352] ELISA-기반 방법은 hIL18/IL12/TxM 및 hIL12/IL18/TxM 융합 단백질 복합체의 형성을 확인하였다. 도 4a에서, 형질 감염된 CHO 세포로부터의 배양 상清액 내의 IL-18/IL-15N72D:IL-12/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체를, 호스래디쉬 퍼옥시다제 접합된, 포획 항체, 항-인간 IL-15 항체(MAB647, R&D Systems) 및 검출 항체와 함께 huIgG1/IL15-특이적 ELISA를 사용하여 검출하였다. 이것을 알려진 농도의 유사한 항체 TxM 융합 단백질 복합체(2B8T2M)와 비교한다. 융합 단백질 농도를 추정하기 위해 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체로부터의 신호를 2B8 T2M 대조군의 것과 비교할 수 있다. hIL12/IL18/TxM 융합 단백질 복합체로부터 유사한 결과를 수득하였다(도 4b). 정제된 "양 방향" IL-18/TxM 복합체의 경우, 항-IL-18 Ab 포획 및 항-IL-15 Ab 검출을 갖는 ELISA는 융합 단백질 복합체의 형성을 입증하였다(도 4c). 이들 분석의 결과는 가용성 IL-18/IL-15N72D, IL-12/IL-15R α Su/Fc, IL-12/IL-15N72D 및 IL-18/IL-15R α Su/Fc 단백질이 CHO 세포에서 생산될 수 있고 hIL18/IL12/TxM 및 hIL12/IL18/TxM 융합 단백질 복합체가 형성되어 배양 배지로 분비될 수 있음을 입증한다.

[0353] hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 IL-15 면역 자극 활성을 평가하기 위해, 마우스 조혈 세포주인, IL-15-의 존적 32D β 세포의 증식을 평가하였다. 증가하는 수준의 hIL18/IL12/TxM을 200 μ L RPMI:10% FBS 배지 중 32D β 세포(10^4 세포/웰)에 첨가하였고 세포를 37°C에서 2 일 동안 인큐베이션하였다. 이어서 WST-1 증식 시약(10 μ L/웰)을 첨가하였다. 4 시간 후, 대사적으로 활성인 세포에 의한 가용성 포르마잔 염료로의 WST-1의 절단에 기반하여 세포 증식을 결정하기 위해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 복합체(ALT-

803)의 생물 활성은 양성 대조군으로서 평가하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, hIL18/IL12/TxM은 32D β 세포의 세포 증식을 촉진함으로써 IL-15 활성을 입증할 수 있었다. hIL18/IL12/TxM의 활성은, 아마도 IL-18이 IL-15N72D 도메인에 연결되는 것으로 인해, ALT-803의 활성과 비교하여 감소되었다.

[0354] hIL18/IL12/TxM의 IL-15 활성을 추가로 평가하기 위해, 증가하는 농도의 hIL18/IL12/TxM을 200 μ L IMDM:10% FBS 배지 중 32D β 세포(10^4 세포/웰)에 첨가하였고 37°C에서 3 일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 프레스토블루(PrestoBlue) 세포 생존 능력 시약(20 μ L/웰)을 첨가하였다. 4 시간 후, 대사적으로 활성인 세포에 의한, 레사주린-기반 용액인, 프레스토블루의 환원에 기반하여 세포 증식을 결정하기 위해 570 nm(정규화를 위한 600 nm 기준 파장과 함께)에서 흡광도를 측정하였다. 이어서 hIL18/IL12/TxM에 대한 IL-15 생물 활성의 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)를 흡광도와 단백질 농도 사이의 관계에 기반하여 결정하였다. ALT-803의 생물 활성은 양성 대조군으로서 평가하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, hIL18/IL12/TxM은 32D β 세포의 세포 증식을 촉진함으로써 IL-15 활성을 입증할 수 있었다. hIL18/IL12/TxM의 활성은, 아마도 IL-18이 IL-15N72D에 연결되는 것으로 인해, ALT-803의 활성과 비교하여 감소되었다.

[0355] hIL18/IL12/TxM의 IL-18 활성을 평가하기 위해, IL-18 리포터 HEK-블루 IL-18(HEK18) 세포의 활성화를 평가하였다. 증가하는 농도의 hIL18/IL12/TxM을 200 μ L IMDM:10% FBS HEK-블루 배지 중 HEK18 세포(5×10^4 세포/웰)에 첨가하였고 37°C에서 20 내지 22 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 배양 상청액(20 μ L/웰)을 QUANTI-블루 시약(180 μ L/웰)에 첨가하였다. 20 시간 후, 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP) 검출 시약인 QUANTI-블루의 환원에 기반하여 세포 활성화를 결정하기 위해 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이어서 hIL18/IL12/TxM의 IL-18 생물 활성의 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)를 흡광도와 단백질 농도 사이의 관계에 기반하여 결정하였다. 재조합 IL-18의 생물 활성을 양성 대조군으로서 평가하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, hIL18/IL12/TxM은 HEK18 세포를 활성화시킴으로써 IL-18 활성을 입증할 수 있었다. hIL18/IL12/TxM의 활성은, 아마도 IL-18이 IL-15N72D에 연결되는 것으로 인해, 재조합 IL-18의 활성과 비교하여 감소되었다.

[0356] hIL18/IL12/TxM의 IL-12 활성을 평가하기 위해, IL-12 리포터 HEK-블루 IL-12(HEK12) 세포의 활성화를 평가하였다. 증가하는 농도의 hIL18/IL12/TxM을 200 μ L IMDM:10% FBS HEK-블루 배지 중 HEK12 세포(5×10^4 세포/웰)에 첨가하였고 37°C에서 20 내지 22 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 배양 상청액(20 μ L/웰)을 QUANTI-블루 시약(180 μ L/웰)에 첨가하였다. 20 시간 후, 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP) 검출 시약인 QUANTI-블루의 환원에 기반하여 세포 활성화를 결정하기 위해 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이어서 hIL18/IL12/TxM의 IL-12 생물 활성의 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)를 흡광도와 단백질 농도 사이의 관계에 기반하여 결정하였다. 재조합 IL-12의 생물 활성을 양성 대조군으로서 평가하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, hIL18/IL12/TxM은 HEK12 세포를 활성화시킴으로써, 재조합 IL-12와 유사하게, IL-12 활성을 입증할 수 있었다.

[0357] 각 사이토카인(IL-12, IL-18, 및 IL-15)의 개별 활성을 추가로 입증하기 위해, 각각의 사이토카인에 의한 수용체 신호 전달에 반응하여 고유하게 인산화되는 단백질을 이용하여(IL-12:STAT4, IL-18:p38 MAPK, 및 IL-15:STAT5) 유세포 분석-기반 세포내 인단백질 분석을 개발하였다. 1 μ g/ml hIL18/IL12/TxM을 이용한 NK92(aNK) 세포 또는 정제된 인간 NK 세포(95% 초파의 CD56⁺)의 단기 자극(5 내지 15 분) 후 재조합 IL-12(10 ng/ml), IL-18(50 ng/ml) 및 ALT-803(50 ng/ml IL-15 활성)의 최적의 조합에서 보여지는 것과 유사한 반응이 초래되었다(도 9a 내지 도 9f). 이를 결과는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 각 사이토카인 도메인이 그의 특이적 면역 자극 생물학적 활성을 보유함을 입증한다.

[0358] IL-12, IL-18 및 IL-15 활성의 조합은 이들 사이토카인 중 임의의 것 단독보다 NK 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 데 더 효과적이라는 것이 알려져 있다. hIL18/IL12/TxM 복합체의 조합된 사이토카인 활성을 평가하기 위해, aNK 세포를 hIL18/IL12/TxM 복합체(50 nM), IL-12(0.5 nM), IL-18(3 nM), 및 ALT-803(10 nM)의 조합, 또는 각각의 사이토카인 단독과 함께 인큐베이션하였다. 2 일 후, 배양 상청액 중의 IFN- γ 수준을 ELISA 방법으로 결정하였다. 도 10a에 나타난 바와 같이, IL-12, IL-18 및 ALT-803 단독은 aNK 세포에 거의 영향을 미치지 않은 반면 IL-12 + ALT-803 및 IL-18 + ALT-803의 조합은 aNK 세포에 의한 IFN- γ 의 낮은 수준의 생산을 유도하였다. 그러나, hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체 단독 및 IL-12 + IL-18 및 IL-12 + IL-18 + ALT-803의 조합은 aNK 세포에 의한 IFN- γ 의 높은 수준의 생산을 나타냈다. 이를 결과는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체가, 조합된 IL-12, IL-18 및 IL-15 사이토카인의 예상되는 면역 자극 활성을 나타냄을 입증한다. "양 방향" IL-18/TxM 복합체를 이용한 유사한 연구는 aNK 세포에 의해 IFN- γ 를, 다만 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체보

다 적은 정도로, 유도하는 본 복합체의 능력을 입증하였다(도 10b).

[0359] 실시예 3: hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포의 유도

이전 연구는 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포는 포화량의 IL-12(10 ng/ml), IL-15(50 ng/ml), 및 IL-18(50 ng/ml)을 갖는 정제된 NK 세포의 하룻밤 동안의 자극 후에 생체외에서 유도될 수 있음을 보여주었다. 이들 세포는 1) 향상된 증식, 2) IL-2 수용체 α (IL-2R α , CD25) 및 다른 활성화 마커의 발현, 및 3) 증가된 IFN- γ 생산과 같은 기억-유사 특성을 나타낸다. 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포의 생성을 촉진하는 hIL18/IL12/TxM의 능력을 평가하기 위해, 정제된 인간 NK 세포(95% 초과의 CD56 $^{+}$)(5×10^6 세포/ml)를 1 μ g/ml hIL18/IL12/TxM 또는 재조합 IL-12(10 ng/ml), IL-18(50 ng/ml), 및 ALT-803(50 ng/ml IL-15 활성)의 최적 조합을 이용하여 18 시간 동안 자극하였다. 사이토카인 유도된 기억 유사 세포의 유도는 항체-염색 및 유세포 분석 방법에 의해 결정되는 증가된 세포-표면 CD25 및 CD69(자극 마커) 발현 및 세포내 IFN- γ 수준으로서 평가하였다. 결과는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체가 인간 NK 세포와의 하룻밤 인큐베이션 후 IL-12, IL-18 및 IL15의 최적 조합과 유사한 정도로 CD25, CD69 및 세포내 IFN- γ 를 유도할 수 있음을 나타내었다(도 11a 내지 도 11f). 따라서, hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체와의 하룻밤 인큐베이션은 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포를 생성할 수 있다.

이전 연구는 사이토카인-유도된 기억-유사 NK 세포는 포화량의 IL-12(10 ng/ml), IL-15(50 ng/ml), 및 IL-18(50 ng/ml)을 갖는 정제된 NK 세포의 하룻밤 동안의 자극 후에 생체외에서 유도될 수 있음을 보여주었다. 이들 세포는 1) 향상된 증식, 2) IL-2 수용체 α (IL-2R α , CD25)의 발현, 3) 증가된 IFN γ 생산, 4) 퍼포린 및 그랜자임에 의해 매개되는 증대된 세포 독성과 같은 기억-유사 특성을 나타낸다. 사이토카인-유도된 기억-유사 NK 세포의 생성을 촉진하는 hIL18/IL12/TxM의 능력을 평가하기 위해, 정제된 인간 NK 세포(95% 초과의 CD56 $^{+}$, 5×10^6 세포/ml)를 증가하는 농도의 hIL18/IL12/TxM 또는 재조합 IL-12(10 ng/ml), IL-18(50 ng/ml), 및 ALT-803(50 ng/ml IL-15, 3.88 nM)의 최적 조합을 이용하여 12 내지 18 시간 동안 자극하였다. 활성화-전 사이토카인-유도된 기억-유사 세포 표현형의 유도는 항체 염색 및 유세포 분석 방법에 의해 결정되는 증가된 세포 표면 CD25 발현 및 세포내 IFN γ 수준으로서 평가하였다. 도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이, hIL18/IL12/TxM은 인간 NK 세포와의 하룻밤 인큐베이션 후 IL-12, IL-18, 및 ALT-803의 최적 조합과 유사한 정도로 CD25 및 세포내 IFN γ 를 유도할 수 있었다.

[0362] hIL18/IL12/TxM에 의한 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포의 생성을 입증하기 위해, 일차 인간 NK 세포 (2×10^6 /ml)를 hIL18/IL12/TxM(38.8 nM)으로 상기와 같이 16 시간 동안 프라이밍하고, 세척하고, 6 일 동안 저용량 ALT-803(77.6 pM, 1 ng/ml IL-15 등가)에서 휴지시켜 프라이밍된 NK 세포가 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포로 분화 가능하도록 하였다. 사이토카인(IL-12(10 ng/ml) 및 ALT-803(50 ng/ml IL-15 등가)) 또는, 브레펠린 A 및 모넨신의 존재 하에, 백혈병 표적(K562 세포, 5:1 비율)을 이용한 6 시간 재-자극 후 CD25 발현의 유지 및 향상된 IFN- γ 생산을 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포의 생성에 대한 상관 관계로서 평가하였다. 모든 경우에, 대조군으로서의 저용량 IL-15(77.6 pM ALT-803)와 비교하여, hIL18/IL12/TxM을 이용한 프라이밍은 CD25 수준을 향상시켰고(도 13a) 사이토카인 및 백혈병 표적 둘 모두를 이용한 재-자극 후 IFN- γ 의 발현을 증가시켰다(도 13b).

[0363] 후속하여 저용량 ALT-803 또는 IL-15에서 휴지시키고 IL-12 및 IL-15를 이용하여 재자극시킨 인간 NK 세포에 대한, hIL18/IL12/TxM 또는 상이한 사이토카인 조합을 이용한 단기 프라이밍의 효과를 추가로 비교하기 위해 유사한 연구가 수행되었다. 이를 연구를 위해, CIML NK 세포의 증식 및 IFN- γ 생산을 면역 활성화의 척도로서 평가하였다. 도 14a 및 도 14b에 나타난 바와 같이, 인간 NK 세포를 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet)으로 표지하고 배지 단독, IL-12(0.5 nM), IL-18(3 nM), ALT-803(10 nM), ALT-803(10 nM) + IL-18(3 nM), ALT-803(10 nM) + IL-18(3 nM) + IL-12(0.5 nM), 또는 hIL18/IL12/TxM(10 nM)을 이용하여 상기와 같이 프라이밍하였다. 프라이밍 후, 세포를 세척하고 1 ng/ml IL-15(도 14a) 또는 75 pM ALT-803(도 14b)을 함유하는 배지에서 유지한 후 10 ng/mL IL-12 + 50 ng/mL IL-15로 재-자극하지 않거나 재자극하였다. CIML NK 세포의 증식은 셀트레이스 바이올렛 표지의 회색에 의해 결정하였고 세포내 IFN- γ 발현은 세포내 염색 및 유세포 분석에 의해 결정하였다. 개별 사이토카인, ALT-803 + IL-18, 또는 ALT-803 + IL-18 + IL-12를 이용한 프라이밍 또는 프라이밍이 없는 것과 비교하여, NK 세포는 hIL18/IL12/TxM으로 프라이밍하고 이어서 IL-15 또는 ALT-803에서 휴지시키고 후속하여 IL-12 + IL-15로 재자극한 후 더 높은 수준의 세포내 IFN- γ 를 발현하였다. 구체적으로, 표준 hIL18 + IL12 + ALT-803 조합으로 프라이밍된 NK 세포의 약 74% 및 개별 사이토카인으로 프라이밍된 NK 세포의

50% 내지 60%와 비교하여 hIL18/IL12/TxM으로 프라이밍함으로써 생성된 CIML NK 세포의 83% 자극 후 IFN- γ 를 발현하는 것으로 밝혀졌다. hIL18/IL12/TxM으로 프라이밍된 CIML NK 세포는 또한 hIL18 + IL12 + ALT-803 또는 개별 사이토카인으로 프라이밍된 NK 세포보다 셀트레이스 바이올렛 희석에 의해 측정될 때 더 큰 증식을 나타냈다(도 15). 그 결과, hIL18/IL12/TxM을 이용한 인간 NK 세포의 단기 프라이밍이 hIL18 + IL12 + IL-15를 이용한 프라이밍과 동등하거나 그보다 우수한 CIML NK 세포(즉, 증가된 증식 및 면역 활성화(CD25, IFN- γ 발현))를 초래할 수 있음을 확인한다.

[0364] 추가로, 인간 종양 세포에 대한 인간 NK 세포의 세포 독성에 대한 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 효과를 조사하였다. 인간 유방 세포(MDA-MB-231)(셀트레이스 바이올렛 표지됨)를 대조군으로서의 hIL18/IL12/TxM 복합체(10 nM) 또는 ALT-803(10 nM)의 존재 하에 정제된 인간 NK 세포(2 개의 독립적인 공여자; NK1 및 NK2)(E:T 비율; 1:1)와 함께 인큐베이션하였다. 2 일 후, 프로피дум 요오다이드(PI)로 염색한 후 죽은 종양 세포(바이올렛⁺PI⁺)의 백분율을 유세포 분석에 의해 평가하였다. 도 16에 나타난 바와 같이, hIL18/IL12/TxM은 ALT-803보다 유방 종양 세포에 대해 유의하게 더 효과적인 인간 NK 세포 독성을 유도하였다. 이들 결과는 항-종양 NK 세포 활성을 향상시키는 IL-12, IL-18 및 IL-15 조합 치료의 능력과 일관된다.

[0365] hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체는 또한 ALT-803 또는 처리하지 않은 것과 비교하여, 인간 NK 세포에서 그랜자임 B의 발현을 증대시킬 수 있었다(도 17a). 또한, 이들 hIL18/IL12/TxM 활성화된 NK 세포는 또한 IFN- γ 의 향상된 생산을 포함하여(도 17c), 인간 종양 표적에 대한 직접적인 세포 독성 분석 또는 항체-매개 세포 독성 분석에서 더욱 효과적이었다(도 17b). 따라서, hIL18/IL12/TxM과의 하룻밤 인큐베이션은 사이토카인-유도된 기억-유사 NK 세포와 관련된 표현형을 생성할 수 있다.

실시예 4: hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체에 의해 자극된 면역 세포의 항종양 활성

[0367] 생체내 항종양 활성을 갖는 사이토카인 유도된 기억 유사 NK 세포를 유도하는 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 능력을 평가할 것이다. 비장 NK 세포는 표준 방법에 의해 마우스로부터 단리되고 1 μ g/ml hIL18/IL12/TxM, 재조합 IL-12(10 ng/ml), IL-18(50 ng/ml), 및 ALT-803(50 ng/ml IL-15 활성)의 조합 또는 ALT-803 단독(50 ng/ml IL-15 활성)을 이용하여 18 시간 동안 5×10^6 세포/ml로 자극할 것이다. 이어서 세포를 세척하고, 피하 RMA-S 림프종을 지니고 세포 전달 3 시간 전에 5Gy의 총 신체 방사선을 받은 C57BL/6 마우스 내에 정맥내로 입양 전달할 것이다(1×10^6 세포/마우스). 마우스의 생존을 모니터링할 것이다. IL-12 + IL-18 + ALT-803-활성화 NK 세포(CIML NK 세포)로 처리된 종양-보유 마우스는 ALT-803-활성화 NK 세포로 처리된 마우스보다 더 오래 생존할 것으로 예상된다(Ni, J., et al. J. Exp. Med. 2012 209:2351-2365). hIL18/IL12/TxM-활성화 NK 세포를 받는 종양-보유 마우스의 연장된 생존은 hIL18/IL12/TxM이 면역 세포의 생체내 항종양 활성을 증대시키는 생체-외 제제로서 작용할 수 있다는 증거를 제공할 것이다.

[0368] 마찬가지로, 정제된 인간 NK 세포는 1 μ g/ml hIL18/IL12/TxM, 재조합 IL-12(10 ng/ml), IL-18(50 ng/ml), 및 ALT-803(50 ng/ml IL-15 활성)의 조합 또는 ALT-803 단독(50 ng/ml IL-15 활성)을 이용하여 18 시간 동안 5×10^6 세포/ml로 자극될 것이다. 이어서 세포를 세척하고, K562 백혈병 세포를 지니고 세포 전달 후에 저-용량 rhIL-2를 받은 NSG 마우스 내에 정맥내로 입양 전달할 것이다(1×10^6 세포/마우스). 마우스의 생존을 모니터링할 것이다. IL-12 + IL-18 + ALT-803-활성화 NK 세포(CIML NK 세포)로 처리된 종양-보유 마우스는 ALT-803-활성화 NK 세포로 처리된 마우스보다 더 오래 생존할 것으로 예상된다(Romee, R., et al. Sci Transl Med. 2016; 8:357ra123). hIL18/IL12/TxM-활성화 인간 NK 세포를 받는 종양-보유 마우스의 연장된 생존은 hIL18/IL12/TxM이 면역 세포의 생체내 항종양 활성을 증대시키는 생체-외 제제로서 작용할 수 있다는 증거를 제공할 것이다.

[0369] 재발성 또는 불응성 급성 골수성 백혈병(AML)과 같은 악성 종양 환자의 치료를 위해(Romee, R., et al. Sci Transl Med. 2016; 8:357ra123), 환자를 사이클로포스파미드 및 플루다라빈으로 전조건화한 후 hIL18/IL12/TxM 또는 hIL12/IL18/TxM과 함께 16 내지 24 시간 동안 생체외에서 인큐베이션된 동종 이계 훌배수동종 NK 세포로부터 생성된 CIML NK 세포로 치료하는 것을 통하여 치료할 것이다. 세포 전달 후, 환자는 생체내에서 세포를 지지하기 위해 저용량 IL-2를 받을 수 있다. 항종양 반응(객관적 반응율, 무진행 생존 기간, 전체 생존 기간, 재발 까지의 시간, 등)을 평가할 것이며, 이는 hIL18/IL12/TxM 또는 hIL12/IL18/TxM이 악성 종양 환자에서 인간 면역 세포의 항종양 활성을 증대시키는 생체-외 제제로서 작용할 수 있다는 증거를 제공할 것이다. 다른 혈액 또는 고형 종양 또는 감염성 질병을 갖는 환자에서 유사한 연구가 수행될 것이다.

[0370] 이들 연구 각각에서, NK 세포의 지속성 및 기능성은 전달 후 평가될 수 있다. 예를 들어, PBMC는 전달 7 내지

14 일 후에 환자로부터 단리할 수 있고 Ki67-양성(증식 마커) 공여자 NK 세포의 백분율을 유세포 분석에 의해 결정할 수 있다. NK 세포는 또한 종양 세포를 이용하여 재자극될 수 있고 IFN- γ 생산 수준은 유세포 분석에 의해 평가될 수 있다. 이들 연구의 결과는 hIL18/IL12/TxM 또는 hIL12/IL18/TxM을 이용한 생체외 NK 세포의 전달-전 처리가 생체내에서 후속 면역 반응을 증대시키는지 여부를 나타낼 것이다.

[0371] 설시예 5: 마우스에 투여한 후 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체의 면역 자극 효과

[0373] *상기 나타난 바와 같이 hIL18/IL12/TxM 융합 단백질 복합체는 시험관내 면역 세포의 증식 및 반응을 자극하는데 매우 효과적이었다. 생체내에서의 이들 복합체의 활성을 평가하기 위해, 암컷 C57BL/6 마우스에게 20 mg/kg hIL18/IL12/TxM 또는 대조군으로서의 PBS를 복강내 주사하였다. 3 일 후, 마우스를 희생시키고 혈액 및 비장 샘플을 취하여 CD8 T 세포(CD8), CD4 T 세포(CD4), B 세포(CD19) 및 NK 세포(NKp46)에 대한 항체로 염색한 후 유세포 분석에 의해 측정하여 면역 세포 서브세트의 변화를 결정하였다. 도 18a에 나타난 바와 같이, hIL18/IL12/TxM 처리는 PBS 대조군 처리된 마우스와 비교하여 비장 중량에서 2.5-배 증가를 초래하였다. 그러나, 20 mg/kg hIL18/IL12/TxM 처리에서 임상 독성의 징후는 없었다. hIL18/IL12/TxM의 투여는 또한 PBS 대조군과 비교하여, 처리된 마우스의 비장에서 CD8 T 세포 백분율의 2-배 초과 증가 및 NK 세포 백분율의 5.5-배 증가를 초래하였다(도 18b). 추가로, PBS와 비교하여 hIL18/IL12/TxM으로 마우스를 처리한 후 혈액 내 절대 세포 수는 CD8 T 세포의 경우 6.4-배 및 NK 세포의 경우 23-배 증가하였고 혈액 세포 백분율은 CD8 T 세포의 경우 3.9-배 및 NK 세포의 경우 13-배 증가하였다(도 18c 및 도 18d). 이 연구의 결과는 hIL18/IL12/TxM의 투여가 명백한 독성을 유발하지 않으면서 마우스에서 면역 세포, 특히 CD8 T 세포 및 NK 세포에 면역 자극 효과를 제공하였음을 명확하게 나타낸다.

[0374] 다른 구현예

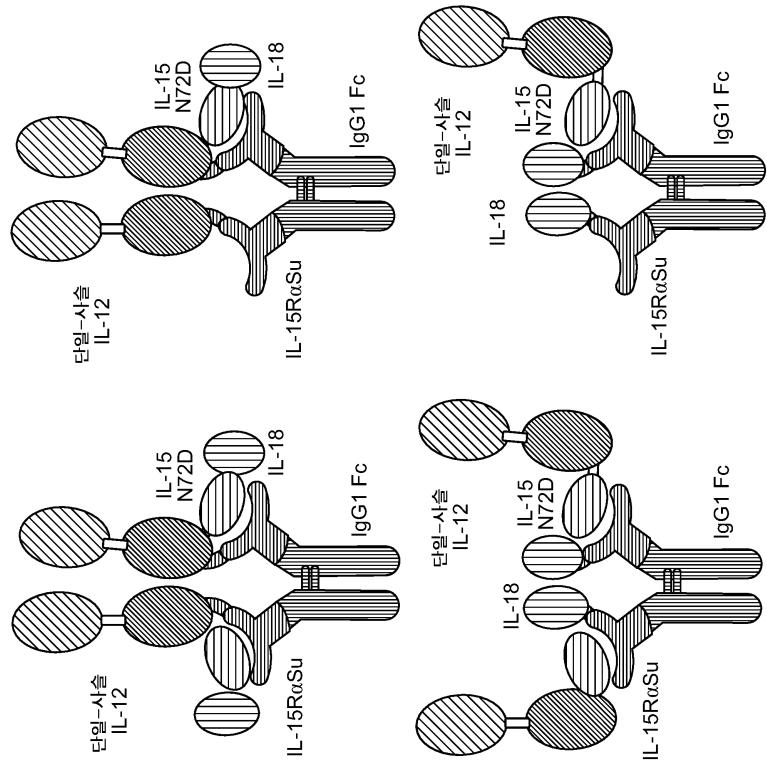
[0375] 본 발명은 이의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 전술한 설명은, 첨부된 청구 범위의 범위에 의해 정의된, 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 것이지 제한하려는 것은 아니다. 다른 양태, 이점, 및 변형은 하기의 청구 범위의 범위 내에 있다.

[0376] 본원에서 참조된 특허 및 과학 문헌은 당업자에게 이용 가능한 지식을 확립한다. 본원에서 인용된 모든 미국 특허 및 공개 또는 미공개 미국 특허 출원은 참조로서 포함된다. 본원에서 인용된 모든 공개 외국 특허 및 특허 출원은 본원에 참조로서 포함된다. 본원에서 인용된 수탁 번호로 표시된 젠뱅크 및 NCBI 제출물은 본원에 참조로서 포함된다. 본원에서 인용된 모든 기타 간행된 참고 문헌, 문서, 원고 및 과학 문헌은 본원에 참조로서 포함된다.

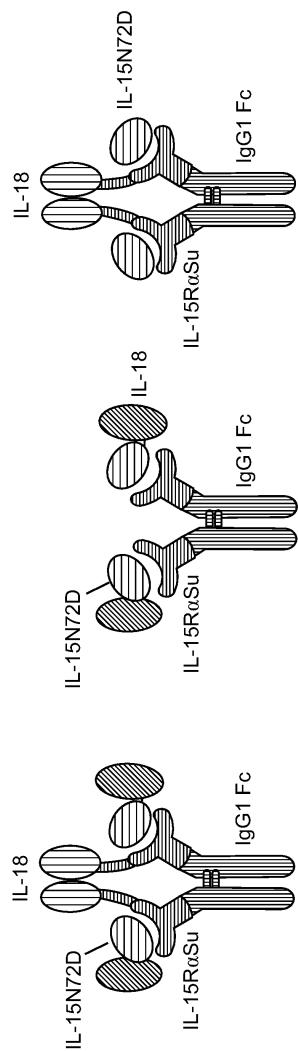
[0377] 본 발명이 이의 바람직한 구현예를 참조하여 구체적으로 나타나고 기재되었지만, 첨부된 청구 범위에 의해 포괄되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부 사항에 있어 다양한 변화가 이루어질 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

도면

도면 1a

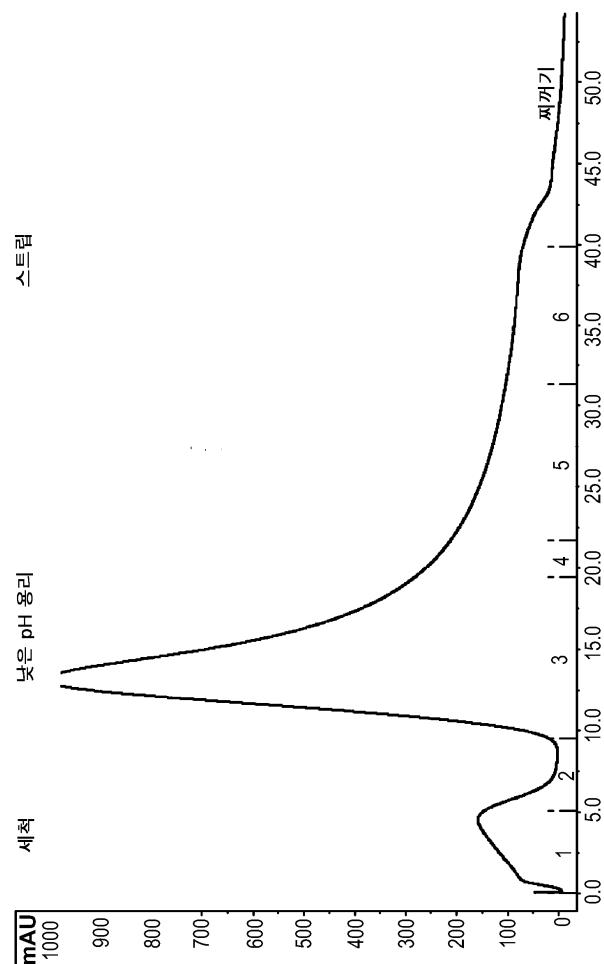


도면 1b



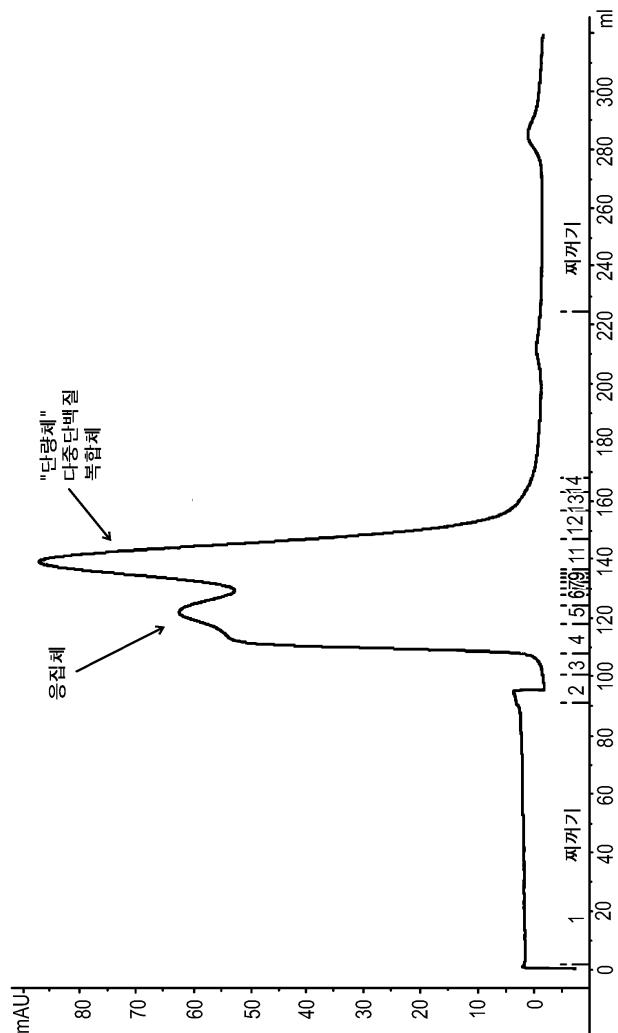
도면 2a

A. 단백질 A 친화성 크로마토그래피



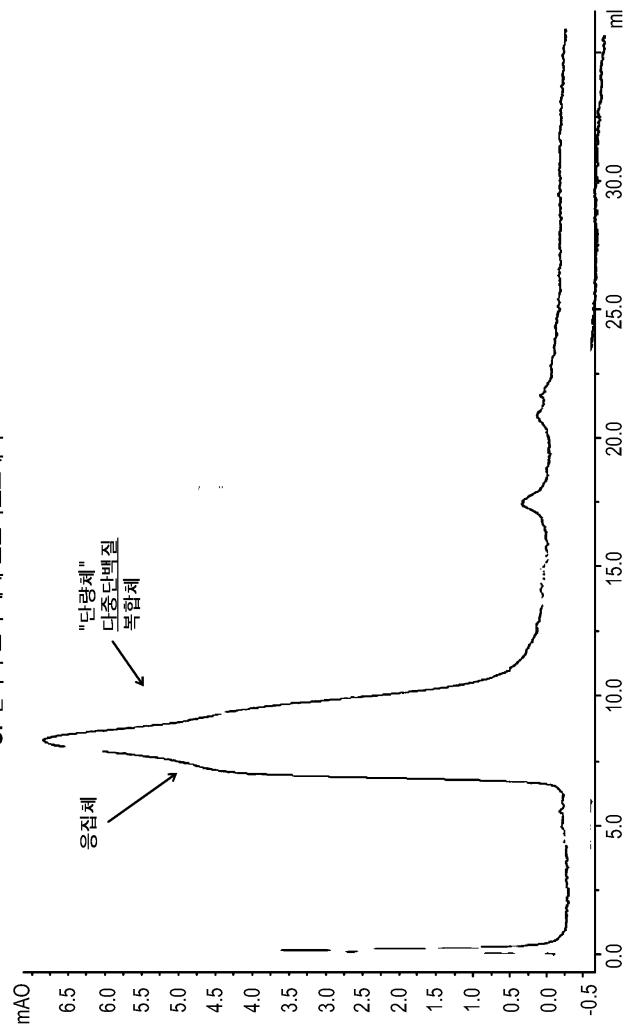
도면2b

B. 크기 배제 크로마토그래피

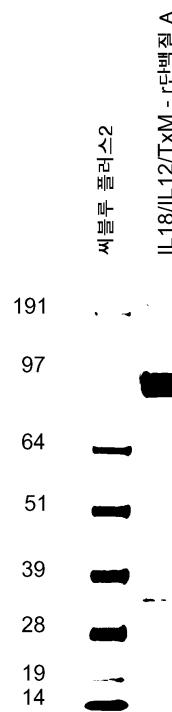


도면 2c

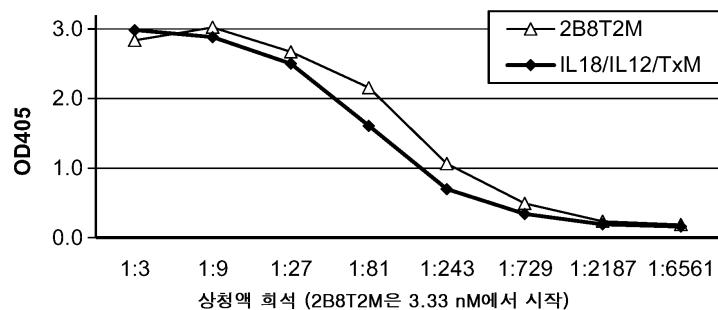
C. 분석적 크기 배체 크로마토그래피



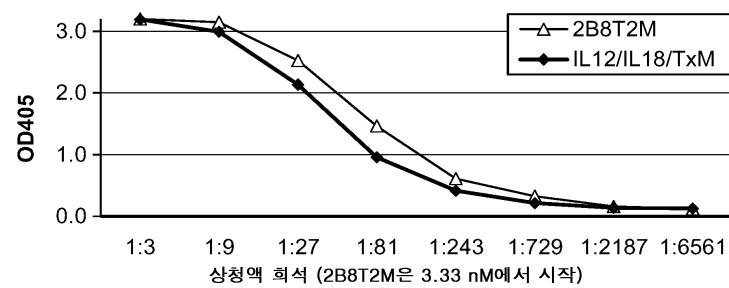
도면3



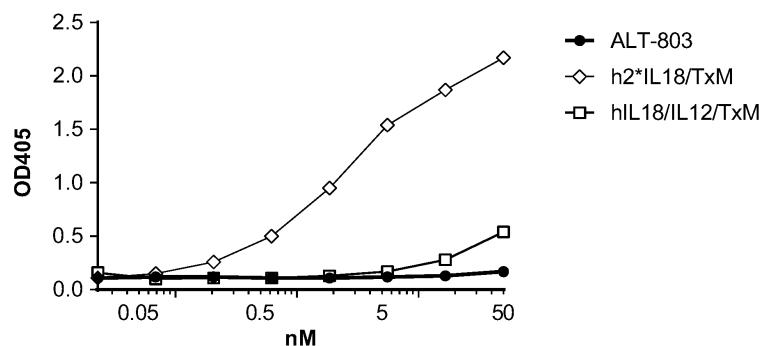
도면4a



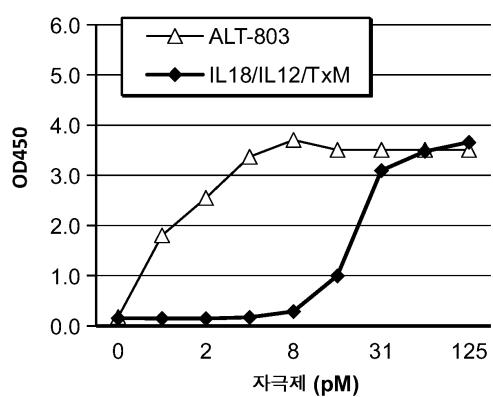
도면4b



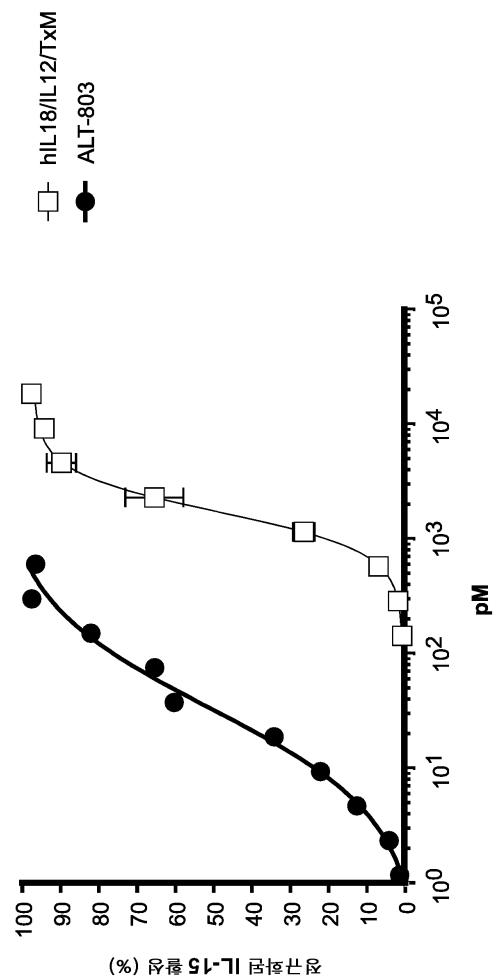
도면4c



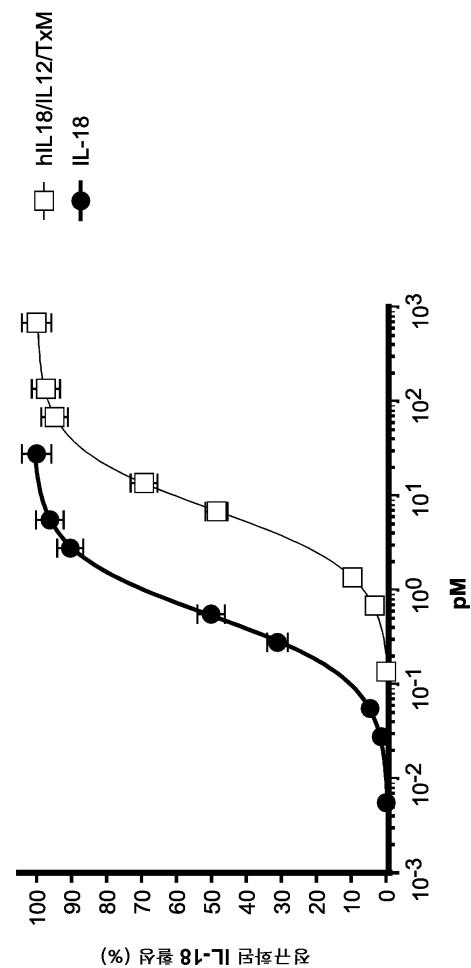
도면5



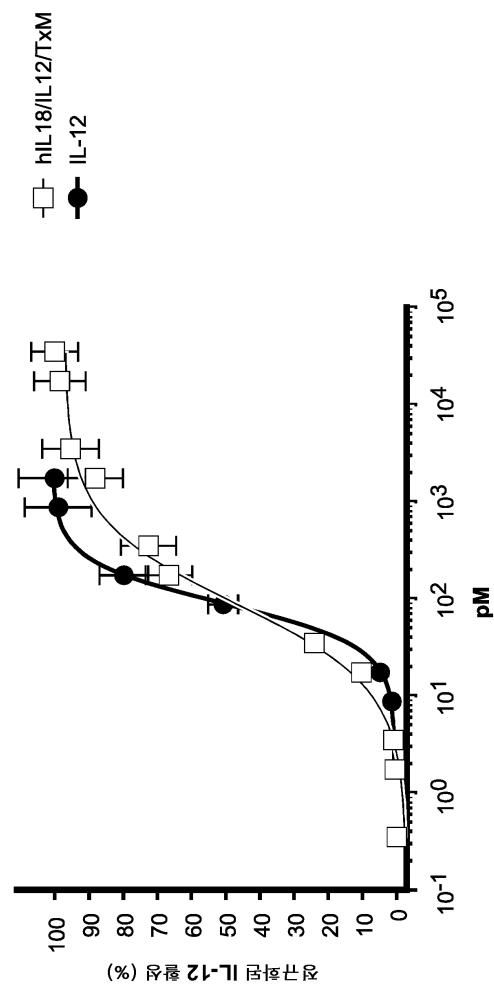
도면6



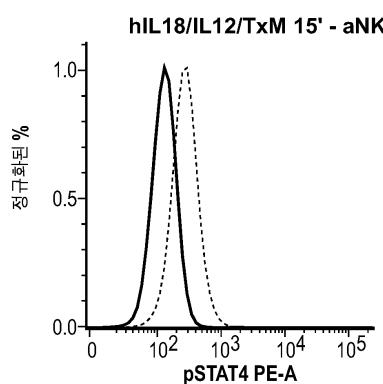
도면7



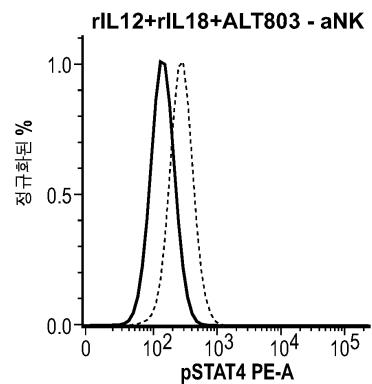
도면8



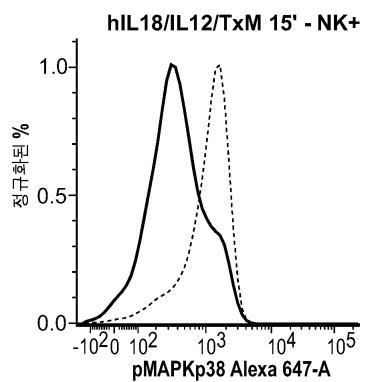
도면9a



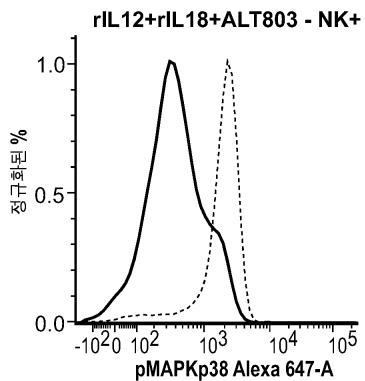
도면9b



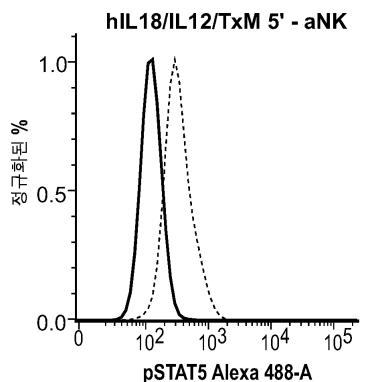
도면9c



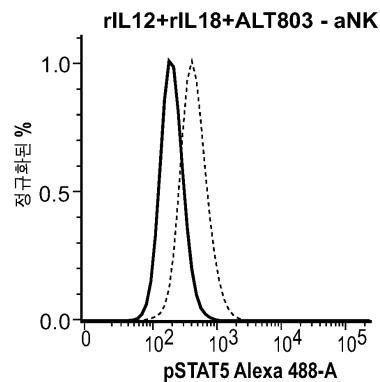
도면9d



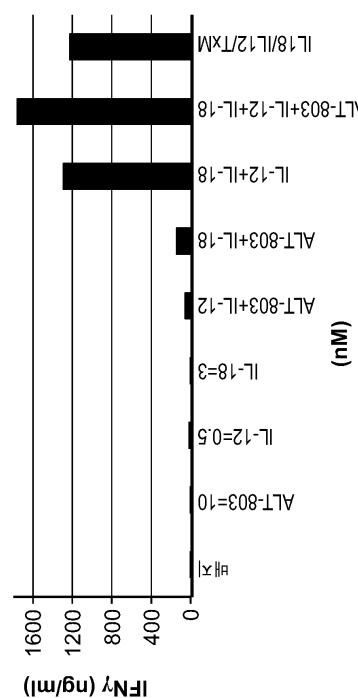
도면9e



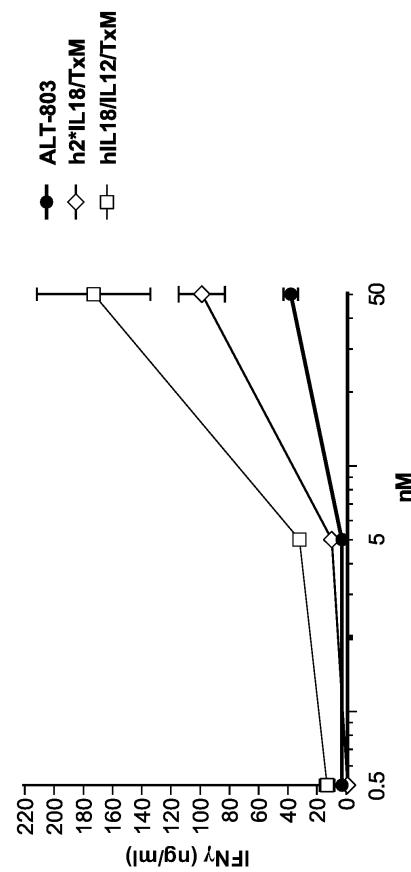
도면9f



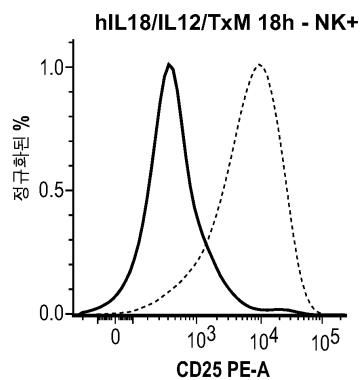
도면10a



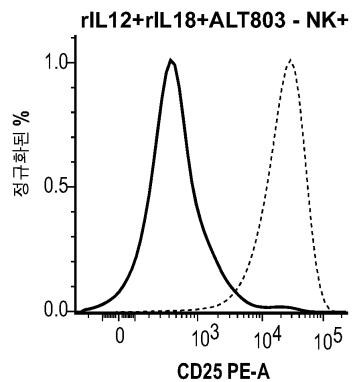
도면10b



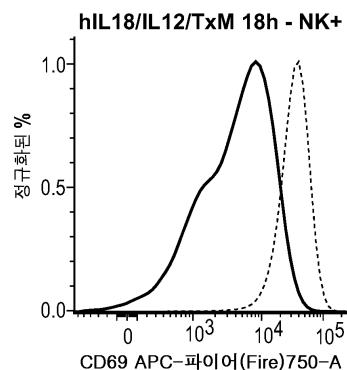
도면11a



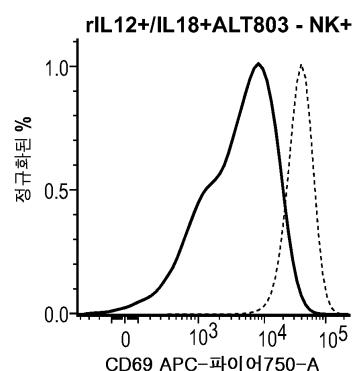
도면11b



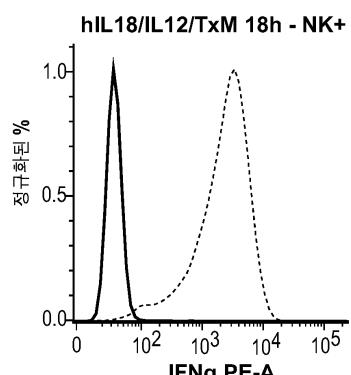
도면11c



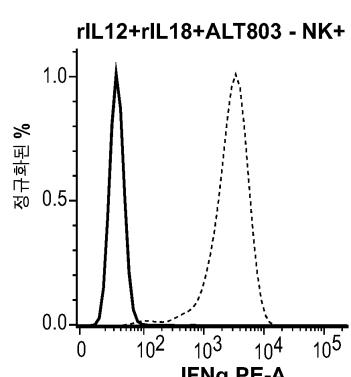
도면11d



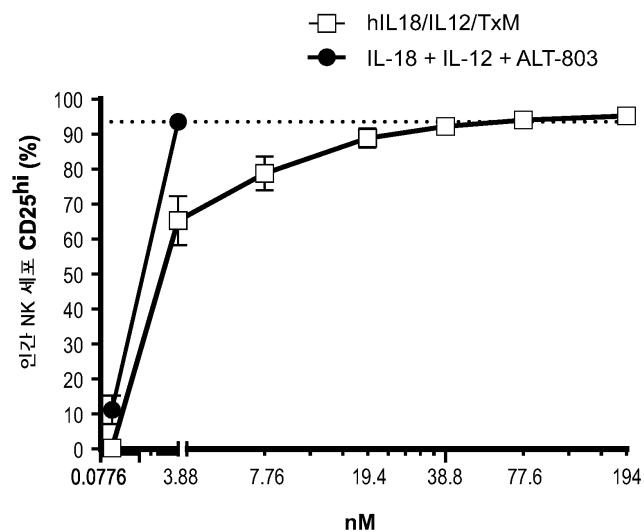
도면11e



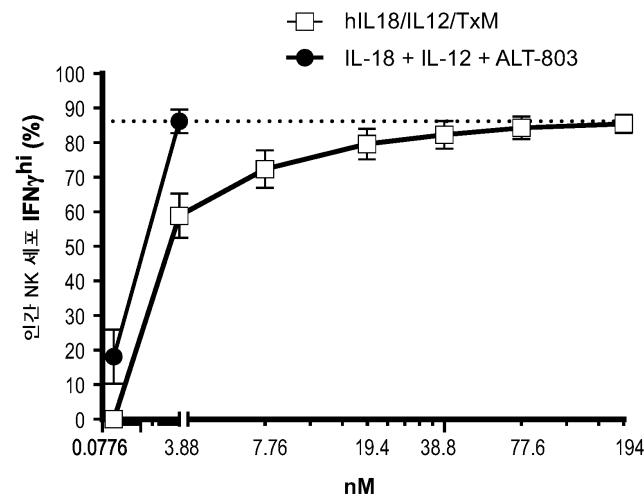
도면11f



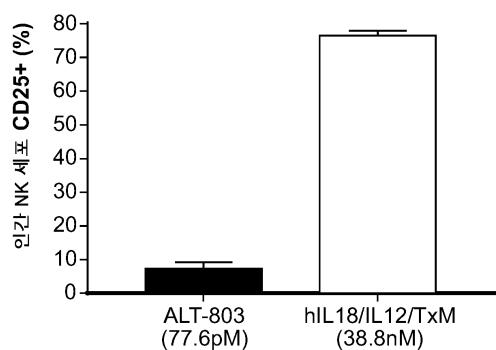
도면 12a



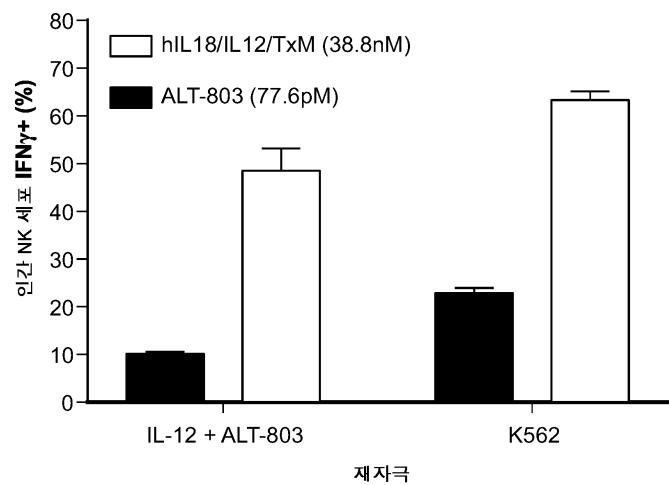
도면 12b



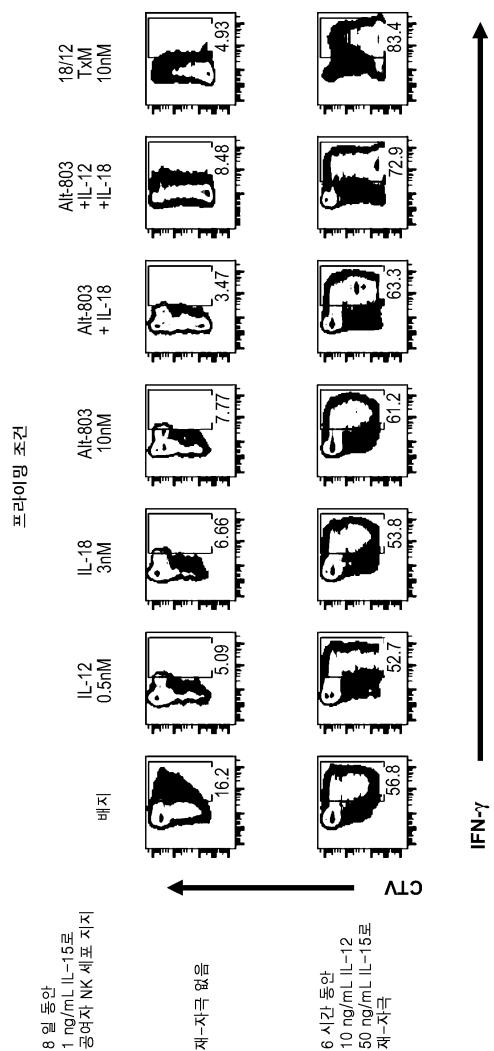
도면 13a



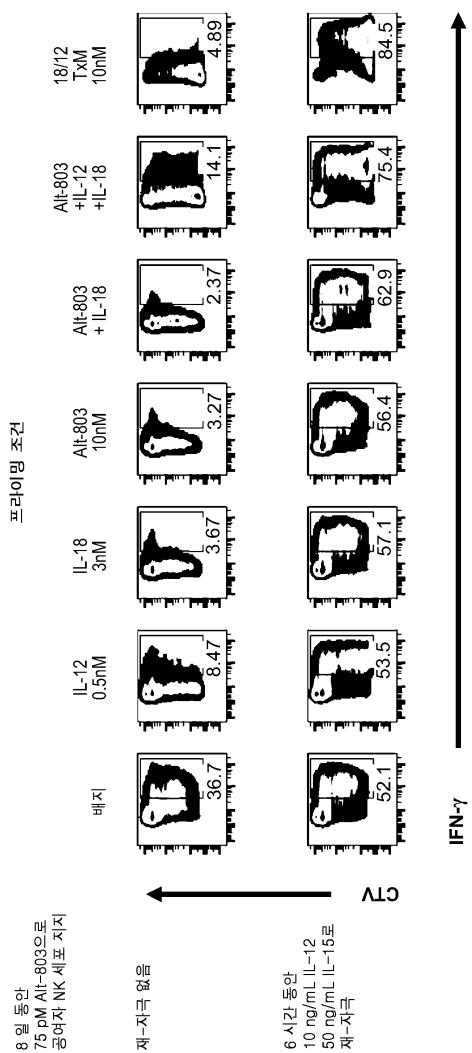
도면 13b



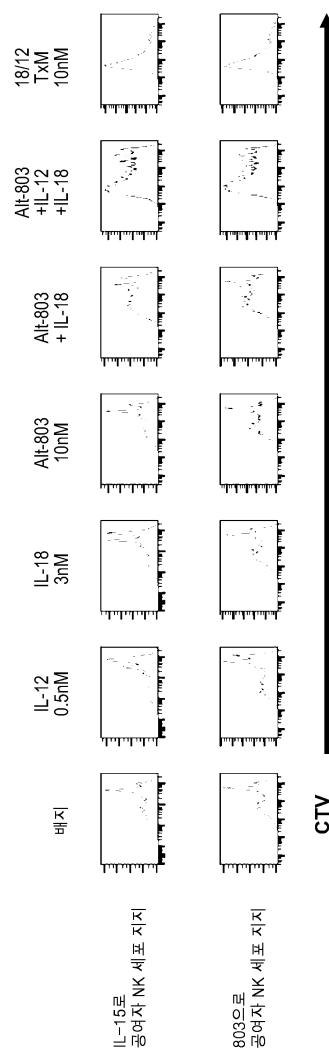
도면 14a



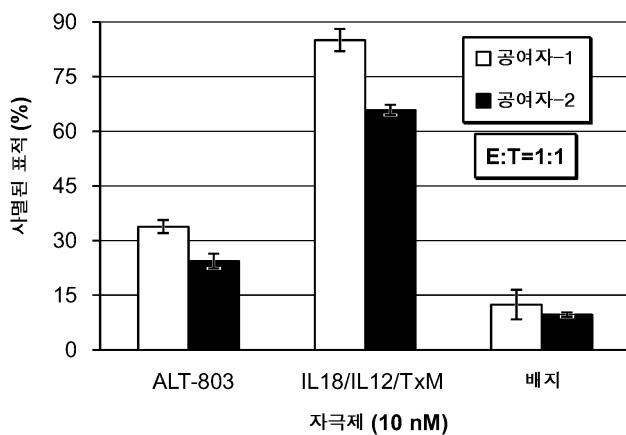
도면 14b



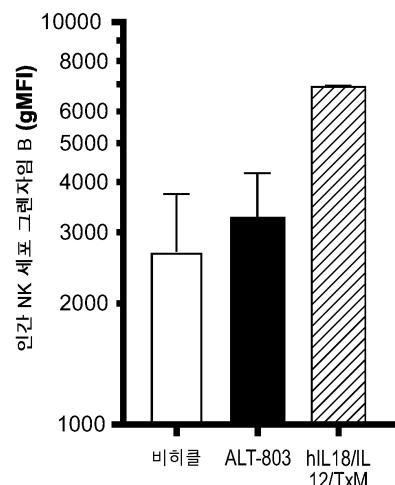
도면15



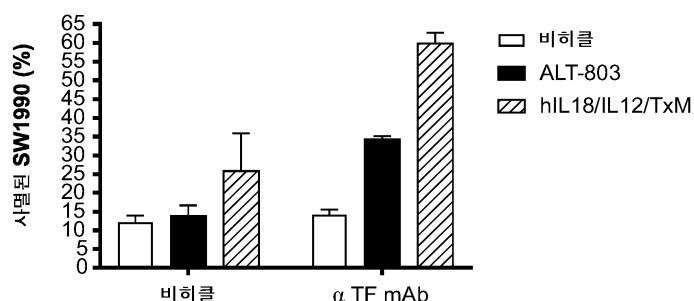
도면16



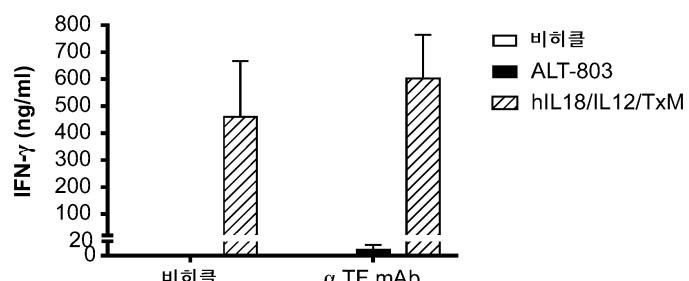
도면17a



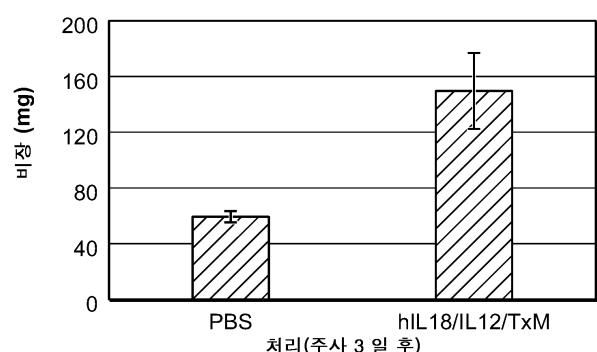
도면17b



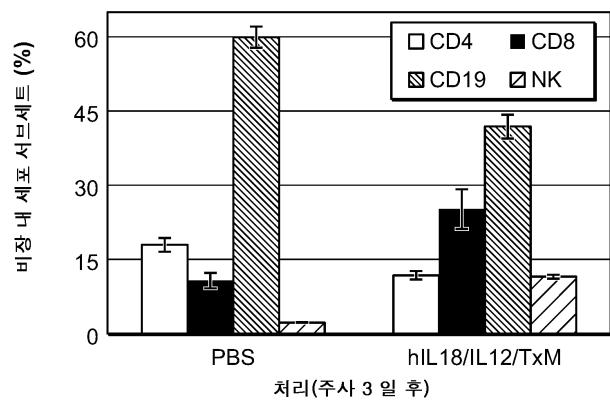
도면17c



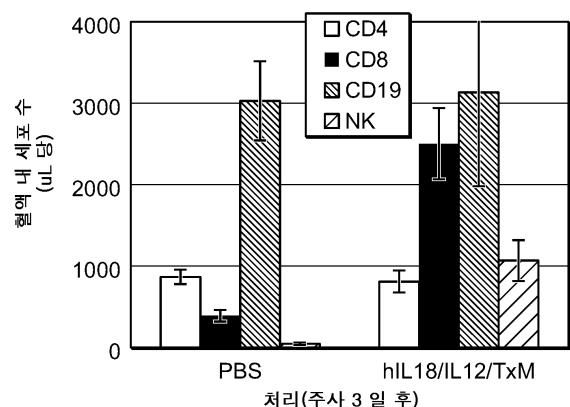
도면18a



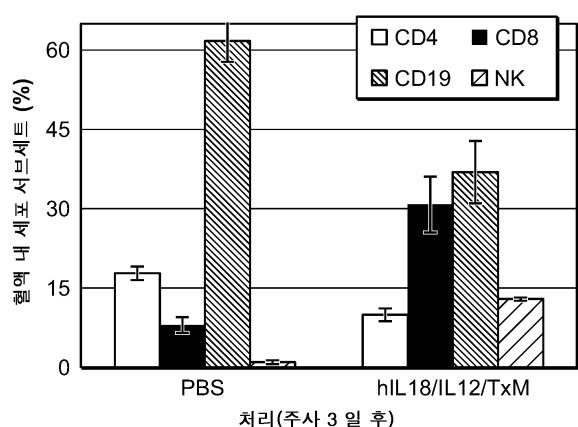
도면18b



도면18c



도면18d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION

<120> IL-15-BASED FUSIONS TO IL-12 AND IL-18

<130> 048277-530001WO

<140> PCT/US2018/021220

<141> 2018-03-06

<150> 62/467,623

<151> 2017-03-06

<160> 13

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 2499

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 1

atgaagtggg tgacccat cagcctgctg ttccctgttct ccagcgccata ctccatctgg 60

gagctgaaga aagacgtgta tgtcgtggag ctggacttgtt atcctgacgc ccccgccgag 120

atggtgtgc tgacatgcga caccccttag gaggatggca tcacatggac cctggaccaa 180

agcagcgagg tgctggctc cgaaaaagacc ctgaccatcc aggtgaagga gttcgccgac 240

gccggccagt atacctgcca taagggaggc gaggtgctgtt cccactccct gtcctgctg 300

cacaagaagg aagatggcat ctggagcacc gatattctga aggaccagaa ggagcccaag 360

aacaaaacctt ttctgcggtg cgaggccaag aattattccg gcaggttac ctgctggtg 420

ctgaccacaa tctccaccga cctgacccatc agcgtcaaga gctccagggg atcctccat 480

cctcaggcgcg tgacctgtgg agctgccacc ctgtccgctg agagggtgag gggcgacaac 540

aaggagtacg agtactccgt cgagtgtcag gaggactccg cctgcccgc tgccgaagag 600

agcctgccta tcgaagtcat ggtggacgcc gtgcacaagc tgaagtatga gaactacacc 660

agcagcttct tcattccggaa cattatcaag cctgatcccc ctaagaacct gcagctcaag 720

ccctgaaga attcccgca agtcgaggtg tcctggagtt accccgacac ctggtccacc 780

cctcactcct atttagcct gacccatgc gtgcagggtc agggcaagag caagagggag 840

aagaaagacc ggggtttcac cgacaagacc agcgttaccc tgatctgtcg gaagaacgct 900

tccatttccg tgcgggctca ggacaggtat tactccct cctggccga gtggctac 960

gtccccctgca gcggaggtgg cggatccgga ggtggaggtt ctgggtggagg tgggagtagg 1020

aacctgcccgg tggctacacc cgaccctgga atgtccctt gtctccacca cagccaaac 1080

ctccctgccccgg ccgtgtccaa catgctgcaa aaggctccgc agacactgga gttctacccc 1140

tgcaccagcg aggagatcga ccatgaggac atcacaagg acaagacaag caccgtggag 1200

gcttgcctcc ccctggaaact gaccaagaat gagtcctgcc tcaacagccg ggagacatcc	1260
ttcatcacca atggctcctg tctggcttcc cggaagacaa gcttcatgtat ggcctgtgc	1320
ctgtccagca tctatgagga cctgaagatg taccaggatcg agtttaagac catgaacgcc	1380

aagctgctga tggaccccaa gcggcaaatac ttccctggacc agaacatgt ggctgtgatc	1440
gacgagctga tgccaggctct gaacttcaac agcgagaccc tgccccagaa gtcctccctg	1500
gaggaggctg attttacaa gacaaaatac aagctctgca tcctcctgca cgcctccgg	1560
atcagggccg tgaccatcga tcgggtgatg tcctacactga atgcttccat cacgtgtcct	1620
cctcctatgt ccgtggaaaca cgcagacatc tgggtcaaga gctacagctt gtactccagg	1680
gagcggtaca ttgttaactc tggttcaag cgtaaagccg gcacgtccag cctgacggag	1740
tgcgtgttga acaaggccac gaatgtcgcc cactggacaa ccccccagtct caaatgcatt	1800

agagagccga aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc	1860
ctggggggac cgtcagtctt cctttcccc caaaaaccca aggacaccct catgatctcc	1920
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag	1980
ttcaacttgtt acgtggacgg cgtggaggatg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	2040
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccc tcctgcacca ggactggctg	2100
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	2160
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	2220

cggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacccctgcc tggtaaagg ctttatccc	2280
agcgacatcg ccgtggagtggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	2340
cctccgtgc tggactccga cggctccttc ttcccttaca gcaagctcac cgtggacaag	2400
agcaggtggc agcagggaa cgtttctca tgctccgtga tgcattggc tctgcacaac	2460
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cctggtaaa	2499

<210> 2

<211> 833

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 2

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1

5

10

15

Tyr Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp

20 25 30

Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr

35 40 45

Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val

50 55 60

Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp

65 70 75 80

Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser

85 90 95

Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile

100 105 110

Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu

115 120 125

Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile

130 135 140

Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp

145 150 155 160

Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val

165 170 175

Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp

180 185 190

Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val

195 200 205

Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe

210 215 220

Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys

225 230 235 240

Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp

245 250 255

Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln

260	265	270
Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp		
275	280	285
Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val		
290	295	300
Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser		
305	310	315
320		
Val Pro Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
325	330	335
Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe		
340	345	350
Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met		
355	360	365
Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu		
370	375	380
Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu		
385	390	395
400		
Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser		
405	410	415
Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys		
420	425	430
Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu		
435	440	445
Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met		
450	455	460
Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile		
465	470	475
480		
Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln		
485	490	495
Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Ile Lys Leu		
500	505	510

Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg
 515 520 525
 Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser
 530 535 540
 Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg
 545 550 555 560
 Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser
 565 570 575

 Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp
 580 585 590
 Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 595 600 605
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 610 615 620
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 625 630 635 640

 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 645 650 655
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 660 665 670
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 675 680 685
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 690 695 700

 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 705 710 715 720
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 725 730 735
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 740 745 750
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

755

760

765

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

770

775

780

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

785 790 795 800

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

805

810

815

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

820

825

830

Lys

<210> 3

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 3

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgtcg ttccctgttct ccagcgccata ctcctacttc	60
ggcaagctgg agtccaagct gtccgtgatc aggaacctga acgaccagggt gctgttcatc	120
gaccaggggca acaggcccct gttcgaggac atgaccgact ccgactgcag ggacaacgcc	180
ccttaggacca tttcatcat ctccatgtat aaggacagcc agcccagggg aatggccgtg	240
accatctccg tgaagtgcga gaagatctcc accctgtcct gcgagaacaa gatcatctcc	300

ttcaaggaga tgaacccccc cgacaacatc aaggacacca agtccgacat cattttttc	360
cagcggtccg tgcccgacac cgacaacaag atgcagttcg agtccttcctc ctacgagggc	420
tactttctgg cctgtgagaa ggagagggac ctttcaagc tcattctgaa gaaggaggac	480
gagctggcg acaggtccat catgttcacc gtgcagaacg aggacaactg gtttaacgta	540
ataagtgatt taaaaaat tgaagatctt attcaatcta tgcatattga tgctacttta	600
tatacggaaa gtgatgttca ccccagttgc aaagtaacag caatgaagt ctttcttttg	660
gagttacaag ttatttact tgagtccgga gatgcaagta ttcatgatac agtagaaaaat	720

ctgatcatcc tagcaaacga cagtttgtct tctaattggga atgtaacaga atctggatgc	780
--	-----

aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaaat attaaagaat tttgcagag tttgtacat 840
 attgtccaaa tggcatcaa cacttct 867
 <210> 4
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 4

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn
 20 25 30

Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe
 35 40 45

Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile
 50 55 60

Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val
 65 70 75 80

Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn
 85 90 95

Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp
 100 105 110

Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp
 115 120 125

Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala
 130 135 140

Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp
 145 150 155 160

Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp Asn
 165 170 175

Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln

180	185	190
Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro		
195	200	205
Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val		
210	215	220
Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn		
225	230	235
Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr		
245	250	255
Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys		
260	265	270
Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr		
275	280	285
Ser		
<210> 5		
<211> 1416		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide		
<400> 5		
atgaagtggg tgacttcat cagcctgctg ttccctgtct ccagcgctta ctcctacttc	60	
ggcaagctgg agtccaagct gtccgtgatc aggaacctga acgaccagggt gctgttcatc	120	
gaccaggcga acaggcccct gttcgaggac atgaccgact ccgactgcag ggacaacgcc	180	
ccttaggacca tcttcatcat ctccatgtat aaggacagcc agcccaggaa aatggccgtg	240	
accatctcg tgaagtgcga gaagatctcc accctgtcct gcgagaacaa gatcatctcc	300	
ttcaaggaga tgaaccccccc cgacaacatc aaggacacca agtccgacat cattttttc	360	
cagcggtccg tgcccgacac cgacaacaag atgcagttcg agtccctctc ctacgaggc	420	
tacttctgg cctgtgagaa ggagagggac ctcttcaagc tcatcctgaa gaaggaggac	480	
gagctggcgc acaggtccat catgttccacc gtgcagaacg aggacatcac gtgtcctcct	540	

cctatgtccg tggAACACGC agacATCTGG gtcaAGAGCT acagCTTGTA CTCCAGGGAG	600
cggTACATT gtaACTCTGG tttCAAGCGT aaAGCCGGCA cgtCCAGCCT gacGGAGTGC	660
gtgtGAACA aggCCACGAA tgcGCCAC tggACAACCC ccAGTCTCAA atgcATTAGA	720
gagCCGAAAT ctTGTGACAA aactCACACA tgCCACCGT GCCAGCACC tgaACTCTG	780
ggggGACCGT cagtTTCTT cttccccca aaACCCAAAGG acaccCTCAT gatCTCCGG	840
accCCTGAGG tcACATGCGT ggtGGTGGAC gtGAGCCACG aagACCCTGA ggtCAAGTTC	900
aactGGTACG tggACGGCGT ggAGGTGCA tATGCCAAGA caaAGCCGCG ggAGGAGCAG	960
tacaACAGCA cgtACCgtGT ggtcAGCGTC ctcACCGTCC tgcACCAAGGA ctGGCTGAAT	1020
ggcaAGGAGT acaAGTGCaa ggtCTCCAAC aaAGCCCTCC cagCCCCAT cgAGAAAACC	1080
atCTCCAAG ccaaAGGGCA gccccGAGAA ccACAGGTGT acaccCTGCC cccatCCGG	1140
gatGAGCTGA ccaAGAACCA ggtcAGCCTG acctGCCTGG tcaaAGGCTT ctatCCCAGC	1200
gacATCGCCG tggAGTGGGA gagCAATGGG cagCCGGAGA acaACTACAA gaccACGCCT	1260
cccGTGCTGG actCCGACGG ctcCTTCTTC ctCTACAGCA agtCACCCTG ggacaAGAGC	1320
aggTGGCAGC agggGAACGT cttCTCATGC tccGTGATGC atGAGGCTCT gcacaACCAC	1380
tacACGCGAGA agAGCCTCTC CCTGTCTCTT ggtAA	1416

<210> 6

<211> 472

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 6

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn

20 25 30

Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe

35 40 45

Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile

50 55 60

Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val

65	70	75	80
Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn			
85	90	95	
Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp			
100	105	110	
Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp			
115	120	125	
Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala			
130	135	140	
Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp			
145	150	155	160
Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp Ile			
165	170	175	
Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys			
180	185	190	
Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe			
195	200	205	
Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys			
210	215	220	
Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg			
225	230	235	240
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
245	250	255	
Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
260	265	270	
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
275	280	285	
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
290	295	300	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
305	310	315	320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	325	330	335
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	340	345	350
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	355	360	365

Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
370						375								380	
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
385															400
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
						405				410				415	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
420									425					430	

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 7

<211> 1950

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 7

atgaagtggg tgacacctat cagcctgtcg ttccgttct ccagcgccata ctccatctgg 60

gagctgaaga aagacgtgta tgtcgtggag ctggactggc atcctgacgc ccccgccgag 120
atggtgtgc tgacatgcga caccctgag gaggatggca tcacatggac cctggaccaa 180
agcagcggagg tgctgggctc cgaaaaagacc ctgaccatcc aggtgaagga gttcggcgac 240
gccggccagt atacctgcca taagggaggc gaggtgctgt cccactccct gtcctgtg 300

cacaagaagg aagatggcat ctggagcacc gatattctga aggaccagaa ggagcccaag	360
aacaaaacct ttctcggtg cgaggccaag aattattccg gcaggttcac ctgctgggtgg	420
ctgaccacaa tctccaccga cctgacacctc agcgtcaaga gctccagggg atcctccgat	480
cctcagggcg tgacctgtgg agctgccacc ctgtccgctg agagggtgag gggcgacaac	540
aaggagtacg agtactccgt cgagtgtcag gaggactccg cctgcctgc tgccgaagag	600
agcctgccta tcgaagtcat ggtggacgcc gtgcacaagc tgaagtatga gaactacacc	660
agcagcttct tcatccggga cattatcaag cctgatcccc ctaagaacct gcagctcaag	720
ccccgtgaaga attccggca agtcgaggtg tcctggagt accccgacac ctggtccacc	780
cctcactcct attttagcct gaccttctgc gtgcaggtgc agggcaagag caagaggag	840
aagaaagacc gggtgttcac cgacaagacc agcgctaccg tcatctgtcg gaagaacgct	900
tccatttcg tgccggctca ggacaggtat tactcctcct cctggccga gtgggctagc	960
gtcccccgtca gcggaggtgg cggatccgga ggtggaggtt ctggtgagg tgggagtagg	1020
aacctgcccc tggctacacc cgaccctgga atgttcccct gtctccacca cagccaaac	1080
ctcctgcggg ccgtgtccaa catgctgcaa aaggctccgc agacactgga gtttacccc	1140
tgcaccagcg aggagatcga ccatgaggac atcacaagg acaagacaag caccgtggag	1200
gcttgcetcc ccctggact gaccaagaat gagtctgcc tcaacagccg ggagacatcc	1260
ttcatcacca atggctcctg tctggcttcc cggaagacaa gttcatgtat ggccctgtgc	1320
ctgtccagca tctatgagga cctgaagatg taccaggtcg agttaagac catgaacgcc	1380
aagctgtga tggaccccaa gcggcaaalc ttccctggacc agaacatgct ggctgtgatc	1440
gacgagctga tgcaggctct gaacttcaac agcgagaccg tgccccagaa gtcctccctg	1500
gaggaggctg attttacaa gaccaaatac aagctctgca tcctcctgca cgccttccgg	1560
atcagggccg tgaccatcga tcgggtgatg tcctacctga atgcttccaa ctgggttaac	1620
gtaataagtg attgaaaaaa aattgaagat cttattcaat ctatgcataat tgatgtact	1680
ttatatacgg aaagtgtatgt tcacccagt tgcaaagtaa cagcaatgaa gtgcatttc	1740
ttggagttac aagttatttc acttgagtcc ggagatgcaa gtattcatga tacagtagaa	1800
aatctgtatca tcctagcaaa cgacagtttgc tcttctaatg ggaatgtaac agaatctgga	1860
tgcaaagaat gtgaggaact ggaggaaaaaa aatattaaag aattttgca gagttttgtat	1920
catatgtcc aaatgttcat caacacttct	1950
<210> 8	
<211> 650	
<212> PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 8

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1	5	10	15												
Tyr	Ser	Ile	Trp	Glu	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Asp
20		25													
Trp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	Glu	Met	Val	Val	Leu	Thr	Cys	Asp	Thr
35		40													
Pro	Glu	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Trp	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Val
50		55													
Leu	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Phe	Gly	Asp
65		70													
Ala	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	Leu	Ser	His	Ser
85		90													
Leu	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser	Thr	Asp	Ile	
100		105													
Leu	Lys	Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Cys	Glu
115		120													
Ala	Lys	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Leu	Thr	Thr	Ile
130		135													
Ser	Thr	Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Asp
145		150													
Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Arg	Val
165		170													
Arg	Gly	Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	Cys	Gln	Glu	Asp
180		185													
Ser	Ala	Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	Glu	Val	Met	Val
195		200													
Asp	Ala	Val	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ser	Phe	Phe

210	215	220
Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys		
225	230	235
Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp		240
245	250	255
Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln		
260	265	270
Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp		
275	280	285
Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val		
290	295	300
Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser		
305	310	315
Val Pro Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		320
325	330	335
Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe		
340	345	350
Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met		
355	360	365
Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu		
370	375	380
Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu		
385	390	395
Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser		400
405	410	415
Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys		
420	425	430
Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu		
435	440	445
Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met		
450	455	460

Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile
 465 470 475 480
 Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln
 485 490 495
 Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu
 500 505 510
 Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg
 515 520 525
 Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp
 530 535 540
 Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr
 545 550 555 560
 Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
 565 570 575
 Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp
 580 585 590
 Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp
 595 600 605
 Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
 610 615 620
 Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val
 625 630 635 640
 His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 645 650

<210> 9

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 9

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1	5	10	15
Gly Ser Thr Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile			
20	25	30	
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu			
35	40	45	
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu			
50	55	60	
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His			
65	70	75	80
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser			
85	90	95	
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Leu Glu			
100	105	110	
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln			
115	120	125	
Met Phe Ile Asn Thr Ser Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu			
130	135	140	
Leu Ile Val Pro Ala Tyr Val Leu Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met			
145	150	155	160
Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser			
165	170	175	
Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr			
180	185	190	
Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His			
195	200	205	
Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 10

Pro Glu Leu Leu Gly Gly

1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 11

Pro Glu Ala Ala Gly Gly

1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 12

Lys Cys Lys Ser Leu

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 13

Lys Cys Ala Ser Leu

1 5